

**Partielle Reinigung und Charakterisierung
eines neuen Wachstumsfaktors für
Interleukin 3 - abhängige Mastzellen der Maus
(MEA: mast cell growth enhancing activity)**

Jochen Moeller

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Partielle Reinigung und Charakterisierung eines neuen
Wachstumsfaktors für Interleukin-3 - abhängige Mastzellen
der Maus (MEA: mast cell growth enhancing activity)**

**Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der**

Ludwig - Maximilians - Universität München

vorgelegt

von

Jochen Moeller

München

Juni 1988

1. **Berichterstatter: Prof. Dr. P. Dörmer**
2. **Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker**

Tag der mündlichen Prüfung: 4. 11. 1988

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

Die folgenden Seiten zeigen die Geschichte der von uns erst im
letzten Jahr erworbenen Sammlung der Bücher, die wir
als Geschenk erhalten haben. Die Bücher sind
in 7 Bänden zusammengefasst.

Die erste Abteilung enthält die Geschichte der Naturwissenschaften,
der Mathematik und der Philosophie, der Geschichte
und der Kunst der Menschheit.

Die zweite Abteilung enthält die Geschichte der
Literatur, der Kunst und der Wissenschaften, und die
Geschichte der Menschheit.

Die dritte Abteilung enthält die Geschichte der
Naturwissenschaften, der Mathematik, der Philosophie,
der Geschichte und der Kunst der Menschheit.
Meinen Eltern
Die vierte Abteilung enthält die Geschichte der
Literatur, der Kunst und der Wissenschaften, und die
Geschichte der Menschheit.

Die fünfte Abteilung enthält die Geschichte der
Naturwissenschaften, der Mathematik, der Philosophie,
der Geschichte und der Kunst der Menschheit.

Die sechste Abteilung enthält die Geschichte der
Literatur, der Kunst und der Wissenschaften, und die
Geschichte der Menschheit.

Die siebte Abteilung enthält die Geschichte der
Naturwissenschaften, der Mathematik, der Philosophie,
der Geschichte und der Kunst der Menschheit.

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1984 bis Juni 1988 am Institut für Experimentelle Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung in München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. P. Dörmer durchgeführt.

Herrn Prof. Dörmer danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, seiner großzügigen und hilfreichen Unterstützung und der Möglichkeit, daß diese Arbeit mit viel Eigeninitiative durchgeführt werden konnte.

Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker danke ich für die fachliche Vertretung der Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie und für sein stetiges Interesse während dieser Zeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Lothar Hültner für seine wertvollen wissenschaftlichen Ratschläge, seiner ständigen Bereitschaft Fragestellungen zu diskutieren und dem großen persönlichen Engagement am Zustandekommen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Edgar Schmitt vom Institut für Immunologie in Mainz danke ich für die ausgezeichnete Betreuung während eines Studienaufenthaltes, für hilfreiche Anregungen und die Überlassung wertvoller Zelllinien.

Für die Durchführung wichtiger biologischer Tests, die an unserem Institut nicht möglich waren, bin ich den Herren Dr. W. Müller (Köln) und Dr. C.J. Sanderson (London) zu Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt vor allem auch meinen anderen Mitarbeitern, besonders Frau Hannelore Broszeit, Frau Monika Welle und Herrn Dr. G. Reisbach für ihre Hilfsbereitschaft, gute Kooperation und das ausgezeichnete Arbeitsklima.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Das hämatopoetische System	1
1.1.1. Ontogenese	1
1.1.2. Hierarchische Organisation	1
1.1.3. Pluripotente Stammzellen	2
1.1.4. Progenitoren	3
1.2. Hämatopoetische Wachstumsfaktoren	4
1.3. Hämatopoetische Funktion stromaler Zellen	6
1.4. Mastzellen	10
1.4.1. Ursprung	10
1.4.2. Morphologie und Funktion	11
1.4.3. Heterogenität	12
1.4.4. Zellkulturen	13
1.4.5. Wachstumsfaktoren für Mastzellen	13
1.4.5.1. Interleukin 3	13
1.4.5.2. Interleukin 4	15
1.4.6. Transdifferenzierung	16
1.5. Aufgabenstellung	16
2. MATERIAL	18
2.1. Spendertiere für Milzzellen	18
2.2. Zelllinien	18
2.2.1. Indikator - Zelllinien	18
2.2.1.1. L138.8A und L167A	18
2.2.1.2. 32D cl.23	20
2.2.1.3. F4/4K.6	20
2.2.1.4. FDC-P1	21

2.2.1.5.	7TD1	21
2.2.1.6.	CTLL-2	21
2.2.2.	»Producer - Zelllinien«	21
2.2.2.1.	WEHI-3B	22
2.2.2.2.	EL-4	22
2.2.2.3.	11B11	22
2.2.2.4.	3T3-L1	22
2.2.2.5.	Mls 4.2	24
2.3.	Medien für Zellkulturen	24
2.4.	Cytokine	25
2.5.	Chemikalien und andere Materialien	26
3.	METHODEN	29
3.1.	Isolierung von Milzzellen	29
3.2.	Zellzählung	29
3.3.	Konditionierte Medien	29
3.3.1.	Milzzell-konditioniertes Medium (serumhaltig)	29
3.3.2.	Milzzell-konditioniertes Medium (serumfrei)	30
3.3.3.	WEHI-3B konditioniertes Medium	30
3.3.4.	EL-4 konditioniertes Medium	30
3.3.5.	3T3-L1 konditioniertes Medium	30
3.3.6.	Mls 4.2 konditioniertes Medium	31
3.3.7.	Anti-IL-4 Antikörper	31
3.4.	Klonierung von Mastzellen	31
3.5.	Pufferwechsel von Proteinlösungen	32
3.6.	Proliferationstests	32
3.6.1.	MTT - Test	32
3.6.2.	Einbau von ^3H -Thymidin	34
3.7.	Nachweis und Quantifizierung von Wachstumsfaktoren	34
3.8.	Proteinbestimmung	34

III

3.9.	Allgemeine Darstellung der verwendeten Trennmethoden für Proteine	35
3.9.1.	Gelchromatographie	35
3.9.2.	Ionenaustausch-Chromatographie	35
3.9.3.	Affinitäts-Chromatographie	36
3.9.3.1.	Procion Red-Agarose Chromatographie	36
3.9.3.1.	Con A-Sepharose Chromatographie	37
3.9.4.	Isoelektrische Fokussierung	37
3.9.5.	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	37
3.10.	Silanisieren von Glasplatten mit Dimethyldichlorsilan	38
3.11.	Ultradünne, rehydratisierbare Gele für IEF	39
3.11.1.	Herstellung	39
3.11.2.	Rehydratisierung und Trennbedingungen	40
3.11.3.	Färbung mit Serva Violett	40
3.11.4.	Färbung mit Silbernitrat	41
3.12.	Herstellung granulierter Gele für präparative IEF	41
3.13.	SDS-Polyacrylamidgele	42
3.13.1.	Herstellung	42
3.13.1.1.	Trenngele	42
3.13.1.2.	Sammelgel	44
3.13.2.	Probenvorbereitung und Lauf	44
3.13.3.	Färben der Gele	45
3.14.	Partielle Reinigung von IL-3 an DEAE-Sephacel	45
3.15.	Partielle Reinigung von MEA	46
3.15.1.	Kationenaustausch-Chromatographie (Schritt-1 Material)	46
3.15.2.	Präparative IEF von SCM	46
3.15.3.	Procion Red-Agarose Chromatographie (Schritt-2 Material)	47
3.15.4.	Con A-Sepharose Chromatographie (Schritt-3 Material)	47



3.15.5. Gelfiltrationen	48
3.15.5.1. Sephadex G-100	48
3.15.5.2. TSK-250	48
3.15.6. SDS-PAGE	49
3.15.7. Analytische IEF in ultradünnen Gelen	49
3.15.7.1. Native Fokussierung	49
3.15.7.2. Fokussierung in Harnstoff	50
3.16. Hitze - Behandlung von SCM	51
3.17. Protease-Behandlung von MEA	51
3.18. Partielle Reinigung von IL-2 und IL-4	51
 4. ERGEBNISSE	 52
4.1. Entdeckung von »mast cell growth enhancing activity« (MEA)	52
4.2. Untersuchung unspezifischer Einflüsse auf MEA-Effekte	52
4.3. Untersuchung anderer Cytokine auf MEA-Effekte	53
4.3.1. Vergleich von MEA mit IL-4	54
4.3.2. Vergleich von MEA mit weiteren Cytokinen	56
4.4. Responsivität von 32Dcl.23 Zellen auf IL-3, IL-4 und MEA	56
4.5. Partielle Reinigung von IL-3 aus WEHI-3B-CM durch Anionenaustausch-Chromatographie	58
4.6. Partielle Reinigung von MEA	60
4.6.1. Trennung von MEA und IL-4 durch Kationenaustausch-Chromatographie (Schritt-1)	60
4.6.2. Trennung von MEA und IL-3 durch Procion Red-Agarose Affinitäts-Chromatographie (Schritt-2)	62
4.6.3. Con A-Sepharose Affinitäts-Chromatographie von Schritt-2 MEA (Schritt-3)	67
4.7. Biochemische Eigenschaften von MEA	70
4.7.1. Temperaturstabilität	70
4.7.2. Protease - Empfindlichkeit	71
4.7.3. Molekulargewicht	71

4.7.4. Isoelektrischer Punkt	72
4.8. Biologische Wirkungen von MEA	76
4.9. MEA-Produktion durch Zelllinien	76
4.10. Ungeeignete Methoden für die Reinigung von MEA	78
5. DISKUSSION	81
6. ZUSAMMENFASSUNG	88
7. LITERATURVERZEICHNIS	89

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

BFU	Zelle, die eine Kolonie mit mehreren Zentren bildet (burst forming unit)
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFC	Kolonie bildende Zelle (colony forming cell)
CFU	Kolonie bildende Zelle (colony forming unit)
CM	konditioniertes Medium (conditioned medium)
Con A	Concanavalin A
const.	konstante Menge
CSF	Kolonie stimulierender Faktor (colony stimulating factor)
CTMC	Bindegewebs-Mastzellen (connective tissue mast cells)
D bzw. kD	Dalton bzw. Kilodalton
DEAE-	Diethylaminoethyl-
Epo	Erythropoetin
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G-CSF	Granulozyten-CSF
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-CSF
Gy	Gray
HPLC	Hochauflösende Flüssigchromatographie (high performance liquid chromatography)
hu	human
IEF	isoelektrische Fokussierung
IFN- γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IL-1 (bzw. 2-6)	Interleukin 1 (bzw. 2-6)
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's Medium
M	molar
mA	Milliampère
M-CSF	Makrophagen-CSF
MEA	Mastzellwachstums-verstärkende Aktivität (mast cell growth enhancing activity)
MG	Molekulargewicht

VII

MMC	mukosale Mastzellen (mucosal mast cells)
MTPBS	für murine Zellen isotoner Phosphatpuffer (mouse tonicity phosphate buffered saline)
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromid
mu	murin
NGF	Nerven - Wachstumsfaktor (nerve growth factor)
OD ₅₇₇₋₆₉₀	optische Dichte, Extinktion des Meßstrahls (577 nm) abzüglich der des Referenzstrahls (690 nm)
PAGE	Polyacrylamid - Gelelektrophorese
pI	Isoelektrischer Punkt
PLAS	Post-Lipid A-Serum
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PWM	Pokeweed - Mitogen
rCytokin	rekombinantes Cytokin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI - 1640	Roswell Park Memorial Institute - Kulturmedium 1640
SCM	Milzzell - konditioniertes Medium (spleen cell conditioned medium)
SDS	Natriumlaurylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- α	Transformierender Wachstumsfaktor α (transforming growth factor α)
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (unit)
V	Volt
Vh	Voltstunden
v/v	Volumeneinheit pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewichtseinheit pro Volumen
w/w	Gewichtseinheit pro Gewicht

1. EINLEITUNG

1.1. Das hämatopoetische System

1.1.1. Ontogenese

Die ontogenetische Entwicklung des blutbildenden Systems durchläuft im Säugerorganismus drei Phasen und ist nach der Embryonalzeit weitgehend abgeschlossen. In der mesenchymalen Periode bilden sich erste primitive Blutzellen aus mesenchymalem Gewebe der Dottersackwand (Moore und Metcalf, 1970; Metcalf und Moore, 1971). Diese wandern dann in die fötale Leber und Milz ein. Während dieser hepatischen Periode entstehen erste Vorläuferzellen von Erythrozyten, Granulozyten, Makrophagen und Megakaryozyten. In der medullären Periode übernimmt das Knochenmark weitgehend die Hämatopoese und bleibt auch für das gesamte postnatale Leben der Ort für die Selbsterneuerung pluripotenter Stammzellen.

1.1.2. Hierarchische Organisation

Die Effektorzellen des hämatopoetischen Systems, wie Erythrozyten, basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten, Mastzellen, Monozyten, Makrophagen und Thrombozyten sind meist nicht mehr teilungsfähig und besitzen nur eine begrenzte Lebensdauer. Sie müssen deshalb laufend aus unreiferen Vorläuferzellen neu gebildet werden. Diese wiederum sind, ebenso wie lymphoide Zellen, Nachfolger gemeinsamer Stammzellen. Man kann das hämatopoetische System grob schematisch in drei funktionell unterscheidbare Hauptkompartimente einteilen. Das erste und unreifste Kompartiment besteht aus pluripotenten Stammzellen, die offenbar zu unbegrenzter Selbsterneuerung fähig sind. Diese können zu allen primitiven Vorläuferzellen (Progenitoren) differenzieren, die in ihrer Weiterentwicklung auf bestimmte Endzelltypen festgelegt (determiniert) sind

und das zweite Kompartiment bilden. Diese Progenitoren besitzen nur noch eingeschränkte Selbsterneuerung und differenzieren während mehrerer Zellzyklen zu reifen Endzellen. Sie bilden das dritte Kompartiment der hämatopoetischen Effektorzellen, die ausschließlich für die funktionellen Aufgaben des Blutsystems verantwortlich sind. Hämatopoese ist ein kontinuierlicher und gut geregelter Prozeß, der den Bedarf an Effektorzellen nicht nur für den natürlichen Verschleiß deckt, sondern auch auf einen erhöhten Verlust an Zellen nach Blutungen oder Infektionen reagieren kann. (Metcalfe, 1984).

1.1.3. Pluripotente Stammzellen

Die Pluripotenz hämatopoetischer Stammzellen wurde nach Transplantationsversuchen bei Mäusen deutlich. Da sich Stammzellen und frühe Progenitoren morphologisch nicht von kleinen, undifferenzierten Blasten unterscheiden (Nicola et al., 1981), kann ihre Existenz nur indirekt in vivo oder in vitro aufgrund ihrer Nachkommenschaft bestimmt werden. Diese enthält dann morphologisch erkennbare Vorläuferzellen und terminal differenzierte Zellen verschiedener hämatopoetischer Reihen (gemischte Kolonien).

Till und McCulloch (1961) stellten bei letal bestrahlten und durch syngenes Knochenmark rekonstituierten Mäusen fest, daß die Zahl der makroskopisch sichtbaren Knötchen, die sich in der Milz nach 9-14 Tagen gebildet hatten, direkt proportional zur injizierten Zellzahl war. Die Bildung der Kolonien in der Milz (CFU-S: colony forming unit in the spleen) war fortan ein brauchbarer Test zur Quantifizierung hämatopoetischer Stammzellen.

Durch Verwendung chromosomaler Marker konnte die Klonalität der CFU-S bewiesen werden (Becker et al., 1963; Chen und Schooley, 1968; Fowler et al., 1967; Wu et al., 1967). Individuelle Milzzellkolonien waren ebenfalls zur weiteren CFU-S Bildung in der Lage und stellten das gesamte hämatopoetische System einer letal bestrahlten Maus wieder her (Siminowitch et al., 1963). Allerdings besitzen nicht

alle Milzzellklone aufgrund funktioneller Heterogenität das gleiche Potential zur Selbsterneuerung und Differenzierung (Magli et al., 1982; Till et al., 1964).

Stammzellen sind nach heutigen Erkenntnissen weitgehend immortal und besitzen eine hohe Selbsterneuerungskapazität (Harrison, 1973; Ross et al., 1982; Valeriote und Tolen, 1983). In vitro gelang es in Knochenmark - Langzeitkulturen der Maus (Dexter et al., 1977a) CFU-S bildende Zellen auf einem Rasen adhärenter stromaler Zellen mindestens sechs Monate in Proliferation zu halten (Dexter et al., 1985). Durch engen Zell-zu-Zell Kontakt entsteht hier ein geeignetes in vitro - Mikromilieu (Bently, 1981), so daß sich in diesen Kulturen laufend determinierte Vorläuferzellen und reife Endzellen bildeten (Dexter, 1977b).

1.1.4. Progenitoren

Als Progenitoren werden die Zellen bezeichnet, die während der Hämatopoese das Kompartiment zwischen den pluripotenten Stammzellen und morphologisch erkennbaren Zellreihen durchlaufen und bereits in bestimmte Differenzierungsrichtungen festgelegt sind. Sie besitzen ein weit geringeres Maß an Selbsterneuerungskapazität als Stammzellen und differenzieren im Laufe einer Vielzahl von Mitosen zu reifen Endzellen.

Seit Einführung semisolider Medien aus Agar (Bradley und Metcalf, 1966; Pluznik und Sachs, 1965) und Methylzellulose (Iscoe und Sieber, 1975), in denen Zellen zwar arretiert, aber nicht an der Teilung gehindert werden, ist es möglich, Progenitoren in vitro zur Proliferation und Differenzierung anzuregen und quantitativ zu erfassen (Humphries et al., 1979; Johnson und Nicola, 1984). Dabei bilden sie Kolonien (50 und mehr Zellen), Bursts (Kolonien mit mehreren Zentren) und Cluster (weniger als 50 Zellen) und werden deshalb auch als BFU (burst forming unit), CFU (colony forming unit) oder CFC (colony forming cell) bezeichnet. Zur näheren Charakterisierung

dieser Vorläuferzellen dient der Kolonietyp, der gebildet wird, als Prä- oder Postfix, z. B. CFU-E oder M-CFC (E: Erythrozyten/ Eo: Eosinophile/ G: neutrophile Granulozyten/ M: Makrophagen/ Meg: Megakaryozyten/ Mast: Mastzellen/ Multi- oder -mix: gemischte Kolonien, bestehend aus mehreren Endzelltypen). Die Entwicklung der terminal differenzierten Zellen aus pluripotenten Stammzellen wird durch Wachstumsfaktoren gesteuert und ist in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt.

1.2. Hämatopoetische Wachstumsfaktoren

Hämatopoetische Stammzellen und Progenitoren können nur in geeigneter Umgebung proliferieren und differenzieren. Dazu tragen sowohl lösliche Wachstumsfaktoren (Abbildung 1.1) als auch stromale Zellen, wie Fibroblasten und Endothelzellen, mit ihrer extrazellulären Matrix bei. Bei den heute bekannten hämatopoetischen und lymphatischen Mediatoren handelt es sich meist um Glykoproteine mit Molekulargewichten zwischen 12 - 70 kD, die ihre biologische Aktivität in äußerst geringen Konzentrationen von 10^{-11} - 10^{-13} M entfalten. Ein solcher Faktor wirkt oft auf verschiedene Zellpopulationen und kann je nach Art der Zielzelle Proliferation, Differenzierung, funktionale Inhibition oder Aktivierung auslösen. Andererseits reagiert eine bestimmte Zellpopulation oft auf verschiedene Faktoren oder Faktor-Kombinationen unterschiedlich, so daß die Regulation der Hämatopoese mit einem komplizierten Netzwerk verglichen werden kann (Metclaf, 1986; O'Garra et al., 1988; Sachs, 1987; Sieff, 1987).

Aufgrund der vielfältigen biologischen Wirkungen dieser Mediatoren, die von verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander entdeckt und mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen wurden, entstanden meist eine Vielzahl von Synonymen, die sich erst nach Aufklärung der Protein- oder Gensequenz auf eine Substanz zurückführen ließen.

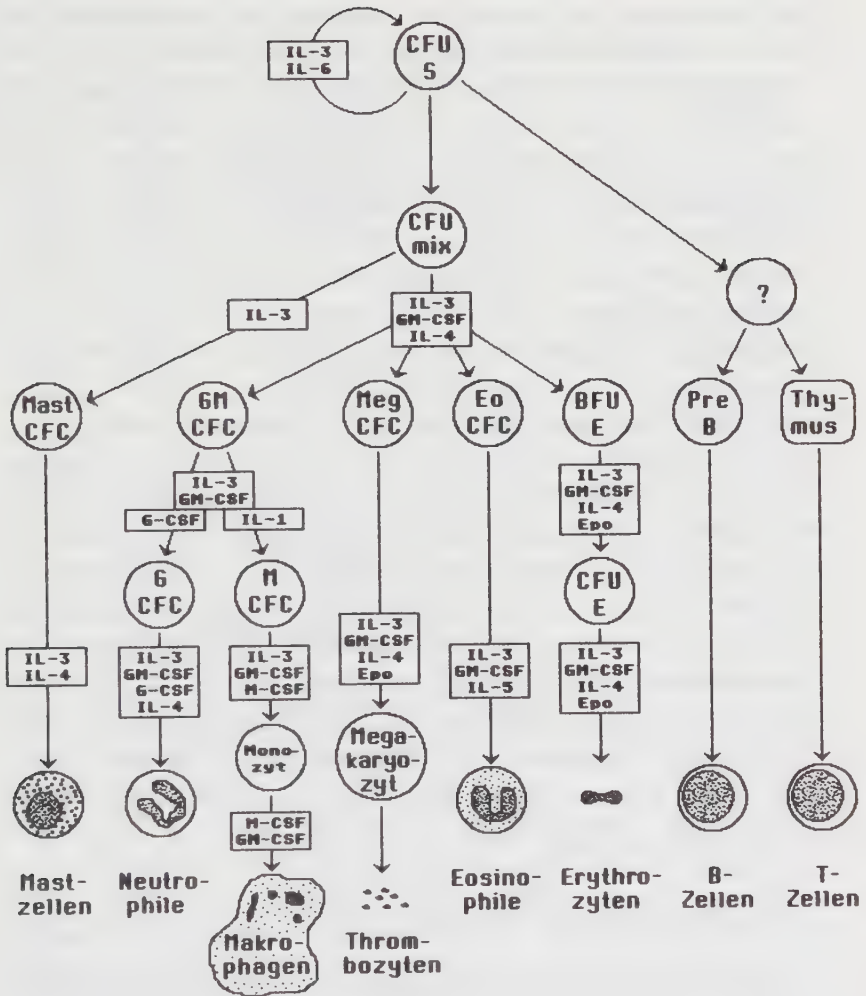


Abbildung 1.1: Entwicklung reifer hämatopoetischer Effektorzellen aus pluripotenten Stammzellen und Progenitoren in Abhängigkeit von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren. Diagramm nach Metcalf (1984), Clark und Kamen (1987); Wachstumsfaktoren ergänzt nach Bartelmez und Stanley (1985), Ikebuchi et al. (1987), Moshizuki et al. (1987), Peschel et al. (1987), Sanderson et al. (1987), Smith und Rennick (1986).

Im Gegensatz zu den klassischen Hormonen, die in bestimmten Organen synthetisiert werden, können sehr viele Zelltypen, wie Endothelzellen, epitheliale Hautzellen, Fibroblasten, Makrophagen und Lymphozyten hämatopoetische Faktoren produzieren (Metcalf, 1984). Für den experimentellen Bedarf lassen sich diese Faktoren aus den Überständen von Zellkulturen gewinnen, die diese entweder konstitutiv oder nach Stimulation ans Medium abgeben (konditionierte Medien). Dabei sind sowohl primäre Zellkulturen, z.B. Mitogen-stimulierte Milzzellen, als auch etablierte leukämischen Linien von Bedeutung, die Cytokine konstitutiv oder nach Induktion mit Mitogenen produzieren und sezernieren.

Eine Gruppe hämatopoetischer Mediatoren, sogenannte Kolonie-stimulierenden Faktoren (CSF; colony stimulating factor), können Progenitoren des Knochenmarks durch direkte Interaktion zur Proliferation und Differenzierung anregen (Bradley und Metcalf, 1966; Ichikawa et al., 1966; Metcalf, 1984), während andere nur in Kombination mit weiteren Faktoren (synergistisch) Proliferation und Differenzierung beeinflussen können und hier als Nicht-CSFs bezeichnet werden.

Die biologischen Wirkungen der CSFs sind zusammen mit den entsprechenden biochemischen Daten in Tabelle 1.1, die der Nicht-CSFs in Tabelle 1.3 zusammengestellt. Diese humanen und murinen Faktoren wurden bereits kloniert und auf ihre Speziespezifität untersucht (CSFs: Tabelle 1.2; Nicht-CSFs: Tabelle 1.4).

1.3. Hämatopoetische Funktion stromaler Zellen

In vitro können hämatopoetische Zellen auch ohne die exogene Zugabe von Wachstumsfaktoren in Knochenmark - Langzeitkulturen auf adhärennten stromalen Zellrasen in Kultur gehalten werden (Dexter et al., 1977a,b). Dieses System zeigt vollständige Regeneration durch Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung der Stammzellen zu determinierten Progenitoren, die zu Endzellen ausreifen. Ein Zell-zu-Zell Kontakt ist bei diesen Kulturen essentiell, da eine

Tabelle 1.1: Humane (h) und murine (m) Kolonie - stimulierende Faktoren mit den wichtigsten biologischen und biochemischen Eigenschaften

Cytokin	Synonyme	Differenzierung der Progenitoren	MG (kD)	pl	Referenzen
GM-CSF	MGI-IGM	Granulozyten Makrophagen	m 23 h 14-35	3.5-4.5	Burgess et al., 1977 Gasson et al., 1984 Wong et al., 1985
G-CSF	MGI-IG, DF	Granulozyten	m 25 h 19.6	5.0-7.0 5.5	Nicola et al., 1983 Welte et al., 1985
M-CSF	CSF-1, MGI-IM	Makrophagen	m 70 dimer h 47-76 dimer	4.0-5.0	Stanley und Heard, 1977 Das und Stanley, 1982
IL-3	Multi-CSF, BPA, PSF, HCGF, MCGF, SAF	Eosinophile Erythrozyten, Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen, Megakaryozyten, Stammzellen.	m 23-30 h	4.5-8.0	Ihle et al., 1982 Otsuka et al., 1988
IL-5	BCGF-II, EDF, IL-4, Eo-CSF, KHF, TRF	Eosinophile zytotox. T-Zellen (Aktivierung) B-Zellen (IgA,IgM)	m 45-60 dimer	5.5	Bond et al., 1987
Epo	EP	Erythrozyten	m 40-45 h 34-39		Cutler et al., 1985 Miyake et al., 1977

Diffusion von Wachstumsfaktoren durch das Medium ausgeschlossen werden konnte (Roberts et al., 1988).

Neuere Untersuchungen zeigen, daß aus Knochenmark etablierte stromale Zellrasen oder klonierte adhärenzte Fibroblasten- bzw. Epithelzelllinien teilweise konstitutiv, meist jedoch nach Induktion mit IL-1 Wachstumsfaktoren wie G-CSF, M-CSF, GM-CSF, Meg-CSF und BPA (burst promoting activity) produzieren können (Fibbe et al., 1988; Lee et al., 1987; Quesenberry et al., 1987); Rennick et al., 1987; Segal et al., 1987; Yang et al., 1988). Die Bindung von Cytokinen an

Tabelle 1.2: Kolonie-stimulierende Faktoren, die bereits kloniert wurden, und ihre Spezies - Spezifitäten auf humane (h) und murine (m) Progenitoren (Sieff, 1987).

Cytokin	Quelle	Gen-Klonierung	Spezifität	Referenzen
GM-CSF	h: Mo-Zelllinie	cDNA (127 AS) genomisch: 4 Exons	h m	Wong et al., 1985
	m: T-Zellen	cDNA (124 AS) genomisch: 4 Exons		Huebner et al., 1985 Gough et al., 1985 Stanley et al., 1985
G-CSF	h: Blasen- karzinom	cDNA (177 AS) genomisch: 5 Exons	h ↔ m	Souza et al., 1986 Strife et al., 1987
M-CSF	h: Urin	cDNA (189 AS)	h → m	Wong et al., 1987
IL-3	h: T-Zell-Klon	cDNA (133 AS)	h m	Otsuka et al., 1986
	m: T-Zellen	cDNA (140 AS) genomisch: 5 Exons		Yokota et al., 1984 Campbell et al., 1985
IL-5	h: T-Zellen	cDNA (134 AS)	h ↔ m	Campbell et al., 1987
	m: T-Zellen	cDNA (133 AS)		Yokota et al., 1987 Lopez et al., 1986 O'Garra et al., 1988a
Epo	h: Urin	cDNA (166 AS)	h ↔ m	Jacobs et al., 1985
AS: Aminosäuren; h → m: humaner Faktor stimuliert murine Progenitoren h m: Spezies - Spezifität; h ↔ m: keine Spezies - Spezifität				

eine extrazelluläre Heparansulfat-Matrix stromaler Zellen, wie es für IL-3 und GM-CSF gezeigt wurde (Roberts et al., 1988), eröffnet die Möglichkeit, daß im Stroma des Knochenmarks dieselben Wachstumsfaktoren beteiligt sind, die bei Abwesenheit adhärenter Zellen zur Selbsterneuerung und Proliferation hämatopoetischer Kulturen verantwortlich sind. Außerdem könnten in die Membran verankerte Wachstumsfaktor-Varianten eine Rolle spielen, wie sie für IL-3 (Metcalf, 1986), GM-CSF (Gough et al., 1985) und M-CSF (Wong et al., 1987) gefunden wurden.

Tabelle 1.3: Nicht-CSF Cytokine des Menschen (h) und der Maus (m) und ihre wichtigsten biochemischen Eigenschaften und biologischen Wirkungen auf hämatopoetische Zellen (O'Garra et al., 1988; mit Ergänzungen).

Cytokin	Synonyme	Zielzellen	MG (kD)	pI
IL-1 α	EP, LAF,	Makrophagen (S/M-CSF)	m 14-17	5.0
IL-1 β	LEM,	Endothelzellen (A,P)		7.0
	h: MCF	Fibroblasten (A,P)	h 15-17	5.0 (α)
	m: BAF	B-Zellen (D,P)		7.0 (β)
		NK-Zellen (A)		
		T-Zellen (A)		
		Hepatozyten (A)		
		Neutrophile (C)		
IL-2	TCGF,	T-Zellen (A,P)	m 25	4.3-4.5
	TMF/TSF,	B-Zellen (D,P)		4.9-5.1
	KHF, TRF	NK-Zellen (A)	h 15	6.8, 7.1
		Monozyten (A)		
IL-4	BCGF, BSF-1,	Mastzellen (S/IL-3)	m 15-20	6.4-6.7
	MAF, MFF,	T-Zellen (S/IL-2)		7.4-7.6
	MCGF-II	B-Zellen (A,D,S/anti-Ig)		8.5-8.7
	TCGF-II	IgE, IgG ₁		
		zytotox. T-Zellen (A)		
		Progenitoren (S/Epo, S/G-CSF)		
IL-6	BSF-2,	Hybridome (P)	m 22-29	5.0-7.0
	BCDF,	Plasmazytome (P)		
	HPF, H/GPF,	B-Zellen (D, Ig-Synthese)		
	IL-HP-1,	Hepatozyten (A)	h 19-21	4.9
	IFN- β_2	Thymozyten (S/IL-4)	34	
IFN- γ	MAF, TRF	Makrophagen (A)	m 38-80	5.5-6.0
		NK-Zellen (A)		
		B-Zellen (A, IgG _{2a})	h 20-25	
			40-60	

Abkürzungen für biologische Aktivitäten: A: Aktivierung; C: Chemotaxis; D: Differenzierung; I: Inhibition; S/Faktor: Synergismus mit Faktor

Tabelle 1.4: Nicht-CSF Cytokine der Hämatopoese, die bereits kloniert wurden und ihre Spezies - Spezifitäten auf humane (h) und murine (m) Progenitoren (O'Garra et al., 1988).

Cytokin	Quelle	Gen-Klonierung	Spezifität	Referenzen
IL-1 α	h: Monozyten m: P388D ₁	cDNA (271 AS) cDNA (270 AS)		March et al., 1985 Lomedico et al., 1984
IL-1 β	h: Monozyten m: PU5-1.8	cDNA (269 AS) cDNA (269 AS)	h $\leftrightarrow$ m	March et al., 1985 Gray et al., 1986 Oppenheim et al., 1986
IL-2	h: Jurkat-III m: T-Zellen	cDNA (153 AS) cDNA (169 AS)	h $\leftrightarrow$ m	Taniguchi et al., 1983 Yokota et al., 1985 Mosmann et al., 1987
IL-4	h: T-Zellen m: T-Zellen	cDNA (153 AS) cDNA (140 AS)	h m	Yokota et al., 1986 Noma et al., 1986 Lee et al., 1986 Mosmann et al., 1987
IL-6	h: TCL-Nal	cDNA (184 AS) genomisch: 5 Exons	h $\rightarrow$ m	Hirano et al., 1986 Yasukawa et al., 1987 Van Damme et al., 1987
IFN- γ	h: T-Zellen m: T-Zellen	cDNA (146 AS) cDNA (136 AS)	h m	Gray et al., 1982 Gray et al., 1983 Friedman et al., 1983
AS: Aminosäuren; h $\rightarrow$ m: humaner Faktor stimuliert murine Progenitoren h m: Spezies - Spezifität; h $\leftrightarrow$ m: keine Spezies - Spezifität				

1.4. Mastzellen

1.4.1. Ursprung

Mastzellen wurden bereits vor mehr als 100 Jahren entdeckt (Ehrlich, 1879) und können anhand der Färbung ihrer zytoplasmatischen Granula mit einigen basischen Farbstoffen, wie Toluidinblau, Astra-Blau oder Alcian-Blau, identifiziert werden (Enerbäck, 1981). Zur Erforschung ihrer Genealogie wurde mit verschiedenen Maus-Mutan-

ten gearbeitet, die entweder Mastzellen mit abnormen Riesengranula hatten oder eine totale Mastzell-Defizienz aufwiesen (Kitamura und Sonoda, 1984). Durch Transplantationsversuche wurde ihre Abstammung von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen (Kitamura et al., 1977).

Morphologisch nicht identifizierbare Mastzell-Progenitoren wandern aus der Blutbahn in die Gewebe ein und differenzieren erst dort zu Mastzellen (Hayashi et al., 1985). Sie besitzen im Gegensatz zu anderen ausgereiften hämatopoetischen Zellen zum Teil noch ein großes proliferatives Potential. Mastzell-Vorläufer aus Bindegewebe können morphologisch nicht von anderen Mastzellen unterschieden werden (Kitamura und Sonoda, 1984).

1.4.2. Morphologie und Funktion

Im Organismus findet man Mastzellen in großer Zahl an Kontaktstellen zur Außenwelt, wie in Haut und Lunge, an Atemwegen und Darmwänden, aber auch an Blutgefäßen und im Peritoneum. Sie sind an Entzündungskrankheiten (Lewis und Austen, 1981), Asthma und allergischen Reaktionen vom Soforttyp (Fletscher und Gershwin, 1983) und Spättyp (Askenase et al., 1983) ebenso grundlegend beteiligt, wie bei der Bekämpfung von Parasiten (Finkelman, 1986; Newlands, 1984) und der Abstoßung allogener Gewebe (Dy et al., 1981).

Bei den oft metachromatisch anfärbbaren Substanzen in den zytoplasmatischen Granula handelt es sich um saure Proteoglykane (Enerbäck, 1981). Die Granula enthalten außerdem vasoaktive Amine (Histamin, Serotonin) und Enzyme wie Proteasen, Arylsulfatase, Galaktosidase, Peroxidase und Superoxid-Dismutase (Kitamura und Sonoda, 1984). Eine weitere Besonderheit der Mastzellen sind ihre IgE-Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Ishizaka, 1969). Die Interaktion von membrangebundenem IgE mit dem entsprechenden Antigen führt zur Degranulation und damit zur Freisetzung von Histamin und

anderer primärer Mediatoren (Ishizaka, 1981). Die Histaminausschüttung kann aber auch durch viele Neuropeptide, z.B. Substanz P (Foreman, 1987), und unspezifische Substanzen, z.B. Ca-Ionophore (Sullivan und Parker, 1976), induziert werden. Als sekundäre Mediatoren gelten Prostaglandine, Leukotriene und PAF (platelet activating factor), die nach Stimulation erst neu synthetisiert werden müssen (Marom und Casale, 1983). Offensichtlich existieren mehrere biochemische Wege, die zur Freisetzung dieser Mediatoren führen, da durch die einzelnen Stimuli oft verschiedene Enzyme aktiviert werden (Ishizaka et al., 1987).

1.4.3. Heterogenität

Aufgrund unterschiedlicher Morphologie, Regulation, Verteilung im Organismus und funktioneller Eigenschaften lassen sich im wesentlichen zwei Subpopulationen von Mastzellen klassifizieren: die Thymus-unabhängigen oder Bindegewebsmastzellen (CTMC: connective tissue mast cells) und die »atypischen«, T-Zell abhängigen oder mukosalen Mastzellen (MMC: mucosal mast cells) (Kitamura und Sonoda, 1984; Jarrett und Haig, 1984). CTMC findet man im Bindegewebe der Haut, im Peritoneum und in der Lamina muscularis mucosae des Magens, während MMC in den mukosalen Schichten des Darmtrakts und der Lamina propria der Atemwege vorkommen (Jarrett und Haig, 1984). Morphologisch und cytochemisch kann man bei Maus und Ratte CTMC von MMC durch ihre zahlreicheren und wesentlich kleineren Granula, ihre charakteristische Rotfärbung nach Behandlung mit Alcian-Blau und Safranin, sowie durch Fluoreszenzfärbung mit Berberinsulfat unterscheiden (Enerbäck, 1981). Biochemische Unterschiede findet man in den Granula. CTMC zeigen eine andere Zusammensetzung an Proteasen (Gibson und Miller, 1986), ca. zehnfach höhere Histamin-Werte als MMC und das Mucopolysaccharid Heparin, während sich in MMC im wesentlichen Chondroitin E-Sulfat nachweisen läßt (Jarrett und Haig, 1984).

Mastzellen vom selben Typ sind aber auch beim Vergleich verschiedener Spezies sehr heterogen (Barrett und Metcalfe, 1984). So enthalten humane MMC große Mengen an Heparin und sind morphologisch kaum von humanen CTMC zu unterscheiden. Sie zeigen aber, ähnlich wie bei der Ratte, unterschiedliche Fixierungs-Eigenschaften und exprimieren verschiedene Proteasen (Enerbäck, 1987; Irani et al., 1986).

1.4.4. Zellkulturen

Die ersten Mastzellen entstanden in vitro aus Thymuszellen auf einem Zellrasen von Fibroblasten (Ginsburg und Sachs, 1963). Erst in neuerer Zeit ist es gelungen, polyklonale und klonale Reinkulturen von Mastzellen mit Hilfe IL-3 haltiger Medien aus hämatopoetischen Zellen der Maus (Knochenmark, Milz, Lymphknoten, Thymus, Blut, fötale Leber) zu etablieren und ständig in Proliferation zu halten (Nagao et al., 1981; Tertian et al., 1981). Sie entstehen aus morphologisch nicht identifizierbaren Progenitoren und lassen sich funktionell dem mukosalen Typ zuordnen (Razin, 1982).

IL-4, ein weiterer vor kurzem entdeckter Mastzellwachstumsfaktor, kann die proliferative Wirkung von IL-3 auf diese Kulturen synergistisch verstärken (Smith und Rennick, 1986; Mosmann et al., 1986). IL-3 und IL-4 erwiesen sich auch als essentiell zur Klonierung peritonealer CTMC in Methylzellulose-Kulturen (Hamaguchi et al., 1987).

1.4.5. Wachstumsfaktoren für Mastzellen

1.4.5.1. Interleukin 3

Murines IL-3 wird normalerweise nur von T-Helferzellen nach allogener oder mitogener Aktivierung produziert (Ihle et al., 1983). Die myelomonozytäre Leukämiezelllinie WEHI-3B sezerniert IL-3 jedoch konstitutiv aufgrund einer retroviralen Insertion vor dem IL-3-Gen,

wodurch dieses ständig angeschaltet bleibt (Ymer et al., 1985).

Die biologischen Wirkungen von IL-3 sind vielfältig und können bewirken, daß Zellen überleben, proliferieren, differenzieren oder funktionell aktiviert werden. So ist IL-3 nicht nur zum Überleben und zur Proliferation von Mastzellen notwendig (Ihle et al., 1983). Es kann auch an der Selbsterneuerung pluripotenter Stammzellen beteiligt sein (Greenberger et al., 1983; Hapel et al., 1985), die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Progenitoren induzieren (Metcalf, 1984) und reife Makrophagen zu Zellteilungen und Phagozytose aktivieren (Crapper et al., 1985).

Ein monoklonaler anti-IL-3-Antikörper ist in der Lage, die biologischen Aktivitäten zu neutralisieren (Abrams und Pearce, 1988).

Nach Reinigung des murinen Proteins (Ihle et al., 1982) und Klonierung der cDNA (Fung et al., 1984; Yokota et al., 1984) konnte IL-3 rekombinant gewonnen werden. Es gelang aber auch eine rein synthetische Darstellung des biologisch aktiven Moleküls (Clark-Lewis et al., 1986).

Interessant ist die Methode zur Gewinnung der cDNA für humanes IL-3, da eine murine Sonde nicht mit dem humanen Gen hybridisierte. Die murine Sequenz war jedoch ausreichend homolog, um mit dem Gen des Gibbon-Affen zu hybridisieren. Die daraus gewonnene Gibbon-cDNA (Yang et al., 1986) war nun in der Lage, mit der humanen Sequenz zu hybridisieren. Die cDNA von humanem IL-3 konnte daraufhin kloniert und sequenziert werden (Otsuka et al., 1988).

Die Bindung von IL-3 an einen spezifischen Rezeptor scheint eine rasche Internalisation des IL-3-Rezeptor-Komplexes nach sich zu ziehen (Schrader, 1986). Weiterhin konnten Walker et al. (1985) zeigen, daß IL-3 die Affinität der Rezeptoren für GM-CSF, G-CSF und M-CSF auf anderen hämatopoetischen Zellen stark vermindert, ohne selbst an diese Rezeptoren zu binden (trans-down-modulation).

1.4.5.2. Interleukin 4

IL-4 wird ebenfalls von T-Helferzellen nach allogener oder mitogener Aktivierung synthetisiert, kann aber auch von Tumorlinien produziert werden (Farrer et al., 1983).

Ähnlich wie IL-3 zeigt auch IL-4 eine Vielzahl an biologischen Aktivitäten und wirkt auf B-Zellen, T-Zellen, BFU-E, CFU-E, CFU-mix, GM-CFC, Meg-CFC, Makrophagen und Mastzellen (Paul, 1987; Peschel et al., 1987). Allerdings ist IL-4 nie allein in der Lage, die Proliferation von Zellen zu stimulieren, sondern wirkt nur synergistisch in Kombination mit anderen Faktoren.

Die Mastzell-vermittelte Immunantwort gegen Parasiten wird durch IL-4 auf zweifache Weise verstärkt. Einerseits unterstützt es die Proliferation von Mastzellen (Smith und Rennick, 1986; Mosmann et al., 1986), und andererseits stimuliert es sowohl die Proliferation von B-Zellen als auch ihre IgE-Produktion (Paul, 1987). Die Bedeutung von IL-4 bei der Abwehr von Parasiten wurde durch in vivo Experimente klar. Die Applikation eines neutralisierenden monoklonalen anti-IL-4 Antikörpers in *Nippostrongylus brasiliensis* infizierte Mäuse verhinderte die normalerweise beobachtete Vermehrung von Mastzellen sowie die Erhöhung des IgE-Spiegels. Daraus resultierte eine starke Immundefizienz der Tiere gegenüber den Parasiten (Finkelman et al., 1986).

Beim IL-4-Gen war es möglich, mit der murinen cDNA (Lee et al., 1986; Noma et al., 1986) das entsprechende humane Gen direkt zu identifizieren und die humane cDNA zu klonieren (Yokota et al., 1986), da beide Sequenzen ausreichend homolog sind, um miteinander zu hybridisieren.

Über den IL-4-Rezeptor weiß man bis jetzt nur sehr wenig. Bindungsstudien mit ^{125}I -IL-4 lassen jedoch auf eine rasche Internalisation von IL-4 nach der Bindung an den Rezeptor schließen. Der IL-4-Rezeptor ist auf vielen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen zu finden (Lowenthal et al., 1988).

1.4.6. Transdifferenzierung

Transdifferenzierung bedeutet die Entwicklung differenzierter Zellen zu einem anderen Phänotyp (Kitamura et al., 1987). Kultiviert man IL-3 abhängige, in vitro etablierte, mukosale Mastzellen auf einem Zellrasen von Fibroblasten, dann entwickeln sich innerhalb von zwei Wochen Mastzellen vom Bindegewebstyp (Dayton et al., 1988; Levi-Schaffer et al., 1986). Auch in vivo konnte nach Transplantation solcher Mastzellen in die Bauchhöhle Mastzell-defizienter Mäuse eine Umwandlung in CTMC nachgewiesen werden (Nakano et al., 1987). Umgekehrt konnten CTMC-Klone aus dem Peritoneum in der Mukosa des Magens zu MMC transdifferenzieren (Kobayashi et al., 1986). Diese Befunde weisen stark auf bipotente Vorläuferzellen hin, die morphologisch nicht von möglicherweise vollständig differenzierten Mastzellen zu unterscheiden sind (Kitamura et al., 1987).

1.5. Aufgabenstellung

Murine Mastzelllinien des mukosalen Typs wurden mit IL-3-haltigem Medium etabliert und passagiert (Hültner et al., 1985). Als IL-3-Quelle diente entweder das konditionierte Medium (CM) der murinen myelomonozytären Leukämiezelllinie WEHI-3B (WEHI-3B-CM), die dieses Cytokin konstitutiv produziert (Ihle et al., 1982), oder das Supernat Pokeweed-Mitogen stimulierter Milzzellen (SCM: spleen cell conditioned medium) der Maus (Nabel et al., 1981).

Beim Vergleich dieser beiden Medien zeigte sich eine deutlich verstärkte Proliferation der Mastzelllinien in Gegenwart von SCM. Auch gereinigtes IL-3 war aufgrund seiner Aktivität nur mit WEHI-3B-CM vergleichbar.

Dieser Befund wies auf eine weitere biologische Aktivität in SCM hin, die von IL-3 verschieden ist und in der Lage ist, das Wachstum von Mastzellen zu verstärken (MEA: mast cell growth enhancing activity).

Von IL-4 ist eine synergistische Wirkung auf die Proliferation von Mastzellen bekannt (Smith und Rennick, 1986; Mosmann et al., 1986). Es galt nun, MEA von IL-3, IL-4 und anderen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren abzugrenzen und näher zu charakterisieren. Dazu war eine partielle Reinigung und biochemische Trennung von anderen Wachstumsfaktoren für Mastzellen notwendig.

Aufgrund der geringen Konzentrationen solcher Wachstumsfaktoren von 10^{-11} - 10^{-13} M in konditionierten Medien (Metcalf, 1986) waren ausschließlich biologische Nachweismethoden erforderlich. Da die verwendeten Mastzelllinien (L138.8A, L167A) keine eindeutige Identifizierung von MEA in Gegenwart von IL-3 und IL-4 erlaubten, waren eine IL-3-sensitive, aber IL-4- und MEA-insensitive Linie (32Dcl.23) und ein neutralisierender anti-IL-4 Antikörper (11B11-Hybridom) weitere essentielle Hilfsmittel zum Nachweis von MEA.

2. MATERIAL

2.1. Spendertiere für Milzzellen

Als Spender für Milzzellen dienten 8-16 Wochen alte Mäuse beiderlei Geschlechts. Die Mausstämme Balb/c, C57Bl/6 und DBA/2 stammten aus GSF-internen Zuchtanlagen. Die Tiere hatten ständig Futter (Fertigfutter der Firma H. Eggersmann KG, Rinteln) und Wasser zur freien Verfügung.

2.2. Zelllinien

Permanente Zelllinien wurden entweder als Indikator-Linien zum quantitativen Nachweis bestimmter Wachstumsfaktoren (z.B. IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, GM-CSF) oder als zelluläre in vitro-Quellen für Wachstumsfaktoren (»Producer-Linien«) eingesetzt (siehe 3.3.). Zur Kultivierung wurden die Medien aus Abschnitt 2.3. verwendet.

2.2.1. Indikator - Zelllinien

Die verwendeten Indikator - Zelllinien sind in Tabelle 2.1 zusammengefaßt. Sie werden nachfolgend im einzelnen vorgestellt und dabei kurz morphologisch und funktionell besprochen.

2.2.1.1. L138.8A und L167A

Am Institut für Experimentelle Hämatologie der GSF wurden aus Knochenmark von C3H- und Balb/c - Mäusen IL-3 - abhängige permanente Zelllinien etabliert (Hültner et al., 1985). Die Linien L167A (C3H) und L138A (Balb/c) einschließlich des Subklons L138.8A waren nach Färbungen mit May-Grünwald-Giemsa, Toluidin Blau, Astra Blau und Alcian Blau basophil granuliert und waren α -Naphthylacetat-esterase - und Naphthol AS-D Chloroacetatesterase - positiv. Eine cy-

Tabelle 2.1

Kulturbedingungen faktorabhängiger Indikator - Zelllinien. Alle Linien wurden bei 37°C und 100 % Luftfeuchtigkeit in 10 % CO₂ - Atmosphäre gezüchtet.

Linie	Zellart	Faktor-Sensitivität	Aussaat (Zellen/ml)	Kulturdauer (d)	Referenz
CTLL-2	cytotoxische T-Zellen	IL-2	1×10 ⁴	3-4	Gillis und Smith, 1977
32D cl.23	myeloische Zellen	IL-3	1×10 ³	7	Greenberger et al., 1983
F4/4K.6	T-Helfer	IL-2, IL-4	5×10 ⁴	7	Schmitt et al., 1987a
FDC-P1	myeloische Zellen	GM-CSF, IL-3, IL-4	2×10 ⁴	3-4	Dexter et al., 1980
LI38.8A	Mastzellen	IL-3, IL-4, MEA	1×10 ³	7	Hültner et al., 1985
LI67A	Mastzellen	IL-3, IL-4, MEA	1×10 ³	7	Hültner et al., 1985
7TD1	Maus-Maus- Hybridom	IL-6	2×10 ⁴	3-4	van Snick et al., 1986

tochemische Färbung war mit Luxol Fast Blau, Safranin, Berberin Sulfat und Amino-peptidase nicht möglich. Die Zellen exprimierten das Oberflächenantigen Ly 5, nicht dagegen die Antigene Lyt 1, Lyt 2, Thy 1.2 und IgM μ . Der Histamingehalt betrug zwischen 33 und 45 ng/10⁶ Zellen. Anhand dieser Daten konnten diese Linien den Mastzellen vom mukosalen Typ zugeordnet werden. Diese Zellen wurden zum Nachweis von IL-4 und MEA verwendet.

Zellkultur: 1×10^3 Zellen/ml, 7 d in 20 % FCS, 20 % serumhaltiges SCM (siehe 3.3.1.), 10 μ M α -Thioglycerol, ad 100 % RPMI-Medium.

2.2.1.2. 32D cl.23

32D cl.23 Zellen wurden von Greenberger et al. (1983) aus retroviral infizierten Knochenmark-Kulturen entwickelt, sind Lyt-1⁺, wachsen streng IL-3 abhängig (Hapel et al., 1984) und eignen sich deshalb zur Quantifizierung von IL-3. Sie wurden ursprünglich als Alcian Blau positive Zellen der basophilen Reihe zugeordnet, besitzen aber in unserem Labor nach Toluidin Blau Färbung keine für basophile Zellen typischen Granula.

Zellkultur: 1×10^3 Zellen/ml, 7 d in 10 % FCS, 10 % WEHI-3B-CM (siehe 3.3.3.), ad 100 % RPMI-Medium.

2.2.1.3. F4/4K.6

Der Klon F4/4K.6 wurde von Schmitt et al. (1987a) aus der Rinderinsulin-spezifischen T-Zelllinie F4 (L3T4⁺) etabliert. Die Zelllinie F4 stammte aus Lymphknoten - Zellkulturen einer gegen Rinderinsulin immunisierten C57 Bl/10 Maus. F4/4K.6 Zellen proliferieren faktorabhängig in Gegenwart von IL-2 und/oder IL-4 und fanden zur Quantifizierung von IL-4 Verwendung.

Zellkultur: 5×10^4 Zellen/ml, 7 d serumfrei in 10 % BSA - Lösung, 1 % Lipid - Emulsion, 0.4 % Transferrin - Lösung, 10 U/ml IL-4 (siehe 3.18.), ad 100 % RPMI-Medium.

2.2.1.4. FDC-P1

FDC-P1, eine myeloische Zelllinie, stammt aus Langzeit-Knochenmark-Kulturen (Dexter et al., 1980) und exprimiert den Makrophagen-spezifischen Marker F4/80 (Hume et al., 1983). Sie wächst faktorabhängig mit IL-3 oder GM-CSF (Hapel et al., 1984). In unserem Labor zeigen FDC-P1 - Zellen auch Responsivität gegenüber IL-4. Mit diesen Zellen konnte folglich IL-3, IL-4 und GM-CSF getestet werden.

Zellkultur: 2×10^3 Zellen, 3-4 d in 10 % FCS, 10 % WEHI-3B-CM (siehe 3.3.3.), ad 100 % RPMI-Medium.

2.2.1.5. 7TD1

7TD1 ist ein Maus-Maus-Hybridom (van Snick et al., 1986), das in vitro spezifisch IL-6 - abhängig wächst und zum Nachweis dieses Cytokins eingesetzt wurde.

Zellkultur: 2×10^4 Zellen, 3-4 d in 10 % FCS, 1000 U/ml IL-6 (siehe 2.4.), ad 100 % RPMI-Medium.

2.2.1.6. CTLL-2

CTLL-2 ist eine IL-2 abhängige zytotoxische T-Zelllinie der Maus (Gillis und Smith, 1977). Obwohl CTLL-2 auch marginal auf IL-4 antwortet, ist IL-4 allein nicht in der Lage, diese Linie in Proliferation zu halten. Hier wurde sie zur Quantifizierung von IL-2 eingesetzt.

Zellkultur: 1×10^4 Zellen, 3-4 d in 10 % FCS, 10 μ M α -Thioglycerol, 30 ng/ml hu rIL-2 (siehe 2.4.), ad 100 % RPMI-Medium.

2.2.2. »Producer - Zelllinien«

Die verwendeten Producer - Zelllinien sind in Tabelle 2.2 zusammen-

gefaßt und werden nachfolgend kurz beschrieben.

2.2.2.1. WEHI-3B

Der Klon WEHI-3B stammt von der Linie WEHI-3, einer myelomonozytären Leukämiezelllinie der Maus, und produziert große Mengen an IL-3 konstitutiv (Clark-Lewis und Schrader, 1981). Deshalb wurde WEHI-3B-CM in dieser Studie (siehe 3.3.3.) zur partiellen Reinigung von IL-3 (siehe 3.14) verwendet.

Zellkultur: 1×10^3 Zellen/ml, 7 d in 10 % BSA - Lösung, 1 % Lipid - Emulsion, 0,4 % Transferrin - Lösung, ad 100 % RPMI-Medium.

2.2.2.2. EL-4

EL-4 ist eine murine Thymomlinie, die nach Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) IL-2, IL-3 und IL-4 produziert (Farmer et al., 1983). EL-4-CM (siehe 3.3.4.) wurde zur partiellen Reinigung von IL-2 und IL-4 verwendet (siehe 3.18).

Zellkultur: 1×10^3 Zellen/ml, 7 d in 10 % FCS, 10 μ M α -Thioglycerol, ad 100 % RPMI-Medium.

2.2.2.3. 11B11

Das Maus - Ratte - Hybridom 11B11 produziert hohe Titer an anti-IL-4 Antikörper vom IgG - Typ konstitutiv (Ohara und Paul, 1985).

Zellkultur: 1×10^4 Zellen/ml, 3-4 d in 10 % FCS, ad 100 % RPMI-Medium.

2.2.2.4. 3T3-L1

3T3-L1 Zellen sind Fibroblasten einer Swiss-Albino Maus und produzieren konstitutiv geringe Mengen einer Aktivität, die zusammen mit IL-3 die Proliferation von Mastzelllinien verstärkt. Da diese Aktivität

Tabelle 2.2
Kulturbedingungen faktorproduzierender Zelllinien. Alle Linien wurden bei 37°C und 100 % Luftfeuchtigkeit in 10 % CO₂ - Atmosphäre gehalten. Die mit Stern (*) gekennzeichneten Faktoren bzw. Antikörper wurden konstitutiv produziert.

Linie	Zellart	Faktor-Produktion	Aussaat (Zellen/ml)	Kulturdauer (d)	Referenz
11B11	Maus-Ratte- Hybridom	anti-IL-4* (IgG)	1×10 ⁴	4-5	Ohara und Paul, 1985
EL-4	Thymom	IL-2, IL-3, IL-4	1×10 ³	7	Farrer et al., 1983
Mls 4.2	T-Helfer	MEA-ähnlich IL-3, IL-4	1×10 ⁶	3-4	Schmitt E., unpubliziert
3T3-L1	Fibroblasten	MEA-ähnlich	1/3 Layer	3	Green und Kehinde, 1974 Green und Meuth, 1974
WEHI-3B	myelomonocy- täre Leukämie	IL-3*, IL-6*	1×10 ³	7	Clark-Lewis und Schrader, 1981

nicht durch anti-IL-4 Antikörper neutralisierbar ist, wurde sie als »MEA-ähnlich« bezeichnet.

Zellkultur: Ein 3 d alter Zellrasen wurde 5-10 min mit isotoner Trypsin - Lösung (0.025 %) behandelt. Anschließend wurde mit derselben Menge Trypsininhibitor - Lösung (0.025 %) die Reaktion gestoppt und 1/3 der Zellen im ursprünglichen Volumen erneut kultiviert (10 % FCS, ad 100 % RPMI-Medium).

2.2.2.5. Mls 4.2

Mls 4.2 ist eine T-Helfer Zelllinie, die von Dr. E. Schmitt (Institut für Immunologie, Johannes Gutenberg Universität, Mainz) aus Balb/c Mäusen nach der Methode von Molnar-Kimber (1980) etabliert wurde. Diese Zellen können in vitro durch allogene Stimulation des Histokompatibilitäts - Nebenlocus D, z.B. mit Milzzellen von DBA/2 Mäusen, zur Proliferation und Faktor-Produktion angeregt werden und benötigen zum Überleben permanent IL-2. Neben einem »MEA-ähnlichen« Faktor, der die Proliferation von Mastzellen zusammen mit IL-3 synergistisch stimulierte und nicht durch anti-IL-4 Antikörper neutralisiert werden konnte, sezernierten sie zusätzlich IL-3 und IL-4.

Das Passagieren der Linie erfolgte alle 3-4 d mit 1×10^6 Zellen/ml in RPMI-Medium (siehe 2.3.) mit 5 % FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 20 μ M α -Thioglycerol und 5 ng/ml hu rIL-2. Um die Linie zu expandieren wurden 2×10^5 Zellen/ml alle 2 - 4 Wochen mit bestrahlten (20 Gy) DBA/2 - Milzzellen (2×10^6 /ml) 2 d inkubiert und für 2 Passagen (je 2 d) mit 2×10^5 Zellen/ml ausgesät.

2.3. Medien für Zellkulturen

RPMI-Medium

RPMI-1640 mit 2 g NaHCO_3 /l und dem Indikator Phenolrot wurde mit 2 mM Glutamin und 100 U/ml Penicillin-Streptomycin ergänzt.

Supplemente für serumfreies Medium

Bei serumfreiem Medium wurde FCS durch 10 % BSA-Lösung, 1 % Lipid-Emulsion und 0.4 % Transferrin-Lösung ersetzt (Iscoves et al., 1980).

<u>BSA-Lösung:</u>	BSA	10 %
	RPML-Medium	ad 100 %
	sterilisiert mit 0.2 µm Filter	

<u>Lipid-Emulsion:</u>	Cholesterin	2 mM
	L-α-Dipalmitoyl-lecithin	1 mM
	Ölsäure	2 mM
	RPML-Medium	ad 100 %
	Homogenisation mit Ultraschall	
	sterilisiert mit 0.2 µm Filter	

<u>Transferrin-Lösung:</u>	hu-Transferrin	6.5 %
	FeCl ₃ x 6 H ₂ O	7.9 mM
	HCl	1 mM
	RPML-Medium	ad 100 %
	sterilisiert mit 0.2 µm Filter	

2.4. Cytokine

Hu rIL-1α wurde von Dr. R. Munker (München), hu rIL-2 von Dr. E. Schmitt (Mainz), murIL-5 von Dr. C. J. Sanderson (London) und murIL-6 von Dr. J. van Snick (Brüssel) zur Verfügung gestellt. Hu TGF-α und hu TNF-α wurde von Dr. P. Petrides (München) erhalten. Als M-CSF Quelle diente L929-Zell konditioniertes Medium (LCCM) und als Quelle von G-CSF post-Lipid A-Serum (PLAS). Beide konditionierte Medien wurden von Dr. L. Hültner (München) überlassen. Muriner Nerven - Wachstumsfaktor (NGF) wurde von Dr. Rohrer (Martinsried) und murines Interferon-γ (IFN-γ) von Prof. Dr. Krammer

(Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Mu GM-CSF und mu rIL-3 wurde von der Fa. Genzyme und Schaf-Erythropoetin von der Fa. Connaught Labs. Ltd bezogen. Aus EL-4-CM wurde mu IL-2 und mu IL-4, aus WEHI-3B-CM mu IL-3 partiell gereinigt.

2.5. Chemikalien und andere Materialien

Amersham Buchler, Braunschweig:

6-³H-Thymidin (21 Ci/mmol).

Amicon, Witten:

Red A; YM10 Ultrafiltrationsmembranen.

J. T. Baker Chemical Co., Deventer, Holland:

Dimethylsulfoxid (DMSO); Isopropanol.

Behring-Werke, Marburg:

humanes Eisen-Transferrin.

BioRad Laboratories, München:

SDS-PAGE Protein Standards.

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Chymotrypsin A₄ aus Rinderpankreas; fötales Kälberserum (FCS);

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); Trypsin-Inhibitor aus Hühnerei.

Desaga, Heidelberg:

Elektrodenstreifen; 1 mm dicke Glasplatten.

Difco Laboratories, Michigan, USA:

Bacto-Agar.

Flow Laboratories, Meckenheim:

FCS.

Fluka, Neu-Ulm:

Dimethyldichlorsilan; Trichloressigsäure (TCA).

Gelman, Michigan, USA:

0.22 μ m Sterilfilter mit 13 mm Durchmesser.

Gibco, Eggenstein:

200 mM Glutamin; 10000 U/ml Penicillin-Streptomycin; RPMI-1640;

2.5 % Trypsin.

E. Merck, Darmstadt:

Calciumchlorid; Essigsäure; Harnstoff; Magnesiumchlorid; Mangan-II-chlorid; Natriumchlorid; 37 % Salzsäure.

Nunc GmbH, Wiesbaden:

Zellkulturflaschen; Zentrifugenröhrchen.

Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg:

DEAE-Sephacel; IEF-Sephadex; NAP-10 Säulen; PD-10 Säulen; Sephadex G-100 superfine; S-Sephadex.

Schleicher & Schüll, Dassel:

0.2 μ m und 0.45 μ m Sterilfilter, jeweils 30 mm Durchmesser

Serva GmbH & Co, Heidelberg:

Acrylamid, 2x kristallisiert; Bromphenolblau; Dialyseschlauch (Visking); 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromid (MTT); Ethylendiamintetraacetat (EDTA); Gel-Fix Haftfolien für PAGE; Gel-Fix Deckfolien; Glycin; 2-Mercaptoethanol; N,N'-Methylenbis-acrylamid; Polyethylenglycol 6000; Serva Blau G 250 (Coomassie

Blau G); Serva Blau R 250 (Coomassie Blau R); Serva Violett 49;
Servalyt 3-10; Servalyt 6-9; Tetramethylethylendiamin (TEMED);
 α -Thioglycerol

3. METHODEN

3.1. Isolierung von Milzzellen

Für die sterile Entnahme von Milzen wurden Mäuse durch Genickbruch getötet und ihr Fell mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die entnommenen Milzen wurden in Kulturmedium mit einem Glaspistill durch ein Edelstahlsieb gedrückt. Durch mehrmaliges Pipettieren wurde eine Einzelsuspension hergestellt.

3.2. Zellzählung

100 µl einer Zellsuspension wurden mit Eosinlösung (0.2 % Eosin und 15 % FCS in physiologischer Kochsalzlösung) im Verhältnis 1:1 vermischt. Die vitalen, nicht angefärbten Zellen wurden in einer Neubauer - Zählkammer gezählt.

3.3. Konditionierte Medien

3.3.1. Milzzell-konditioniertes Medium (serumhaltig)

Zur Herstellung von serumhaltigem Milzzell-konditioniertem Medium (SCM: spleen cell conditioned medium) wurden 2×10^6 Milzzellen/ml von Balb/c Mäusen in RPMI-1640, supplementiert mit 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin-Streptomycin, 5 % fötalem Kälberserum (FCS) und Pokeweed Mitogen (1:300), für eine Woche bei 37°C in 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert (Metcalf und Johnson, 1978). Der Überstand wurde nach Abzentrifugieren der Zellen (20 min; 300 g) geerntet, 5-fach konzentriert (Amicon - Zelle, YM10 - Membran), steril filtriert und bei -20°C aufbewahrt. Serumhaltiges SCM wurde zum Füttern IL-3 abhängiger Zelllinien verwendet.

3.3.2. Milzzell-konditioniertes Medium (serumfrei)

Die Herstellung von serumfreiem SCM erfolgte wie in Abschnitt 3.3.1., jedoch mit der Besonderheit, daß hier anstelle von FCS folgende Supplemente für serumfreie Kulturbedingungen nach Iscoves et al. (1980) verwendet wurden: 10 % BSA - Lösung, 0.4 % Transferrin - Lösung und 1 % Lipid-Emulsion (siehe 2.3.). Serumfreies, 8-fach konzentriertes SCM diente als Ausgangsmaterial zur biochemischen Reinigung von MEA.

3.3.3. WEHI-3B konditioniertes Medium (WEHI-3B-CM)

1×10^6 WEHI-3B Zellen (Ihle et al., 1983; Yung et al., 1981) wurden für 3 Tage in RPMI-1640 mit 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin-Streptomycin, 0.1 % BSA, 0.2 % Fe-Transferrin und 1 % Lipid-Emulsion (Iscove et al. 1980) bei 37°C in 10 % CO₂-Atmosphäre gehalten, mit 100 g abzentrifugiert und 3-4 mal unter denselben Bedingungen rekultiviert. Der IL-3 haltige Überstand wurde zum Füttern IL-3 abhängiger Linien oder zur partiellen Reinigung von IL-3 verwendet.

3.3.4. EL-4 konditioniertes Medium (EL-4-CM)

Zur Herstellung von EL-4-CM wurden 2×10^6 Zellen/ml für 2 Tage in RPMI-Medium (siehe 2.3.) mit 2 % FCS, 10 µM α-Thioglycerol und 20 ng/ml PMA bei 37°C in 10 % CO₂ inkubiert. EL-4-CM enthielt IL-2, IL-3 und IL-4 (Farrer et al., 1983) und wurde als Ausgangsmaterial für partiell gereinigtes IL-2 und IL-4 benutzt.

3.3.5. 3T3-L1 konditioniertes Medium

Ein konfluenter, 3 d alter Zellrasen von 3T3-L1-Fibroblasten wurde in RPMI-Medium (siehe 2.3.) mit 10 % FCS entweder ohne oder mit IL-1α (10 U/ml) bei 37°C in 10 % CO₂-Atmosphäre inkubiert, und nach

48 h der Überstand geerntet.

3.3.6. Mls 4.2 konditioniertes Medium (Mls 4.2-CM)

Mls 4.2 Zellen (10^6 /ml) wurden mit bestrahlten (20 Gy) DBA/2 - Milzzellen (4×10^6 /ml) in RPMI-Medium (siehe 2.3.) mit 5% FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 20 μ M α -Thioglycerol und 5 ng/ml rIL-2 restimuliert. Nach 24 h wurde Mls 4.2-CM durch Zentrifugation (10 min, 100g) geerntet. Die zur Konditionierung verwendeten Zellen konnten für die normale Zellkultur (siehe 2.2.2.5) weiterverwendet werden.

3.3.7. Anti-IL-4 Antikörper

Die Ratten - Hybridomlinie 11B11 (Ohara und Paul, 1985) produzierte biologisch neutralisierende monoklonale anti-IL-4 Antikörper konstitutiv. Im Überstand der Zellkultur (siehe 2.2.2.3) war ausreichend anti-IL-4 - Aktivität, so daß keine von der normalen Kultivierung abweichenden Bedingungen notwendig waren.

3.4. Klonierung von Mastzellen

Die Mastzelllinie L167A wurde in Weichagarkulturen (0.3% Agar) kloniert (Metcalf, 1984). Zu diesem Zweck wurde eine 0.6%ige Agar-Lösung durch 5-10 min Kochen von Bacto-Agar in destilliertem Wasser hergestellt und nach Kühlung auf ca. 50°C mit der gleichen Menge doppelt konzentrierten Mediums (60% IMDM 2x und 40% FCS) gemischt. Die jetzt handwarme Lösung wurde mit Mastzellen versetzt (100 Zellen/ml) und in 1 ml Portionen in Petrischalen (3.5 cm) plattiert, in die entweder 200 μ l SCM oder, als Negativkontrolle, 200 μ l physiologische Kochsalzlösung vorgelegt waren. Nachdem die Zellsuspension durch kreisförmige Bewegung der Petrischalen verteilt war, gelierte der Agar während 10-15 min bei Raumtemperatur. Innerhalb von einer Woche bildeten sich in den SCM-halti-

gen Kulturen bei 37°C in 10 % CO₂-Atmosphäre 70-80 Cluster (< 50 Zellen/Klon) und Kolonien (≥ 50 Zellen/Klon) pro Platte. Es wurden 24 der größten Kolonien mit sterilen Pasteurpipetten aus dem Agarverband gepickt und in 1 ml Kulturen mit dem üblichen Medium für Mastzellen expandiert (siehe 2.2.1.1.).

3.5. Pufferwechsel von Proteinlösungen

Der Pufferwechsel von Proteinlösungen erfolgte entweder durch Dialyse (Ausschlußgröße: 10⁴ D) oder durch Gelfiltration mit Sephadex G-25 (Ausschlußgröße: 5000 D). Bei der Gelfiltration wurden mit entsprechendem Puffer äquilibrierte NAP-10 Säulen mit 1.0 ml Probenvolumen gefüllt und mit 1.5 ml eluiert. Bei größeren Probenvolumina wurden PD-10 Säulen verwendet (2.5 Probenvolumen, 3.5 ml Elutionsvolumen).

Für spätere biologische Tests wurden Aliquots der verschiedenen Fraktionen nach chromatographischen Trennverfahren in serumhaltiges Kulturmedium überführt, um empfindliche Proteine zu stabilisieren. Dafür wurden 950 µl Probe in RPMI-1640 äquilibrierte NAP-10 Säulen gegeben, nach dem Einlauf 50 µl FCS addiert und mit 1.5 ml eluiert. Zum Nachweis biologischer Aktivitäten wurden 5 - 60 % davon in den Testkulturen eingesetzt.

3.6. Proliferationstests

3.6.1. MTT - Test

MTPBS (mouse tonicity phosphate buffered saline):

20 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7.3

150 mM NaCl

Dehydrogenasen von Mitochondrien können MTT (schwach gelb) zu MTT - Formazan (intensiv violett) reduzieren. Da die Enzymaktivität

ten proportional zur Zellatmung und damit auch allgemein zum Stoffwechsel sind, steigt der MTT - Umsatz pro Zeiteinheit mit der Proliferationsgeschwindigkeit eukaryontischer Zellen und mit der Zellzahl. Deshalb kann dieser Test als nicht-radioaktive Alternative zum ^3H -Thymidineinbau verwendet werden (Mosmann, 1983).

In 96-Well Platten wurden 100 μl Zellkulturen für 2-4 Tage bei 37°C in 10 % CO_2 -Atmosphäre gezogen. Nach Zugabe von 10 μl MTT-Lösung (5 mg MTT/ml MTPBS) (Mosmann, 1983) wurden die Kulturen für weitere 4 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde entstandenes MTT - Formazan, das in rein wässrigen Lösungen unlöslich ist, durch Zugabe von 100 μl saurem Isopropanol (40 mM HCl in Isopropanol) gelöst und fotometrisch quantifiziert. Von der Extinktion des Meßstrahls (577 nm) wurde die des Referenzstrahls (690 nm) in einem ELISA - Fotometer abgezogen. Tabelle 3.1 zeigt die Bedingungen des MTT-Tests für die verschiedenen Zelllinien. Jeder Meßwert wurde anhand von Duplikaten oder Triplikaten bestimmt.

Tabelle 3.1: Kulturbedingungen für MTT - Test oder ^3H -Thymidineinbau bei den verschiedenen, verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Zellzahl/ml	Kulturdauer (d)
CTLL-2	5×10^4	2
32D cl.23	5×10^4	2
F4/4K.6	5×10^4	3
FDC-P1	2×10^4	3
L138.8A	4×10^4	3
L167A	4×10^4	3
7TD1	2×10^4	4

3.6.2. Einbau von ^3H -Thymidin

Nach dem Protokoll von Ziegler et al. (1983) wurden die Testzellen in 200 μl Replikaten unter den in Tabelle 3.1 aufgelisteten Bedingungen kultiviert. 2 h nach Zugabe von 20 μl ^3H -Thymidin-Lösung in RPMI-1640 (1 $\mu\text{Ci/Well}$, 0.4 Ci/mmol) wurden die Zellen mit einem Cell-Harvester (Flow, Meckenheim) geerntet und auf Glasfaser-Filter (Whatman, England) gesaugt. Die Zahl radioaktiver Zerfälle pro min wurden in 5 ml Szintillations-Lösung im Szintillationszähler gezählt.

3.7. Nachweis und Quantifizierung von Wachstumsfaktoren

Die Quantifizierung von Wachstumsfaktoren wurde im MTT-Test oder nach Einbau von ^3H -Thymidin mit Hilfe der geeigneten Indikator-Zelllinien (siehe Tabelle 2.1) erreicht. Als 1 U/ml wurde jeweils die Konzentration des Wachstumsfaktors definiert, die in der Lage war, eine halbmaximale proliferative Wirkung zu induzieren (IL-2 bei CTLL-2; IL-3 bei 32Dcl.23, L138.8A oder L167A; IL-2 oder IL-4 bei F4/4K.6; IL-6 bei 7TD1, GM-CSF oder IL-3 bei FDC-P1).

Zur Quantifizierung synergistischer Aktivitäten wurde ab der Plateaukonzentration des Faktors gemessen, zu dem der Synergismus bestand. Auch hier wurde die halbmaximale synergistische Wirkung als 1 U/ml definiert (MEA oder IL-4 bei L138.8A oder L167A mit einer Plateaukonzentration an IL-3).

3.8. Proteinbestimmung

Färbelösung:	100 mg Serva Blau G-250
	50 ml Ethanol (95 %)
	100 ml H_3PO_4 (85 % w/v)
	ad 1000 ml H_2O

Der Proteingehalt von Lösungen wurde fotometrisch nach der Fär-

bung mit Serva Blau G-250 (Bradford, 1976) als Differenz der Extinktionen des Meßstrahls (620 nm) abzüglich des Referenzstrahls (492 nm) und des Leerwerts bestimmt. Die Meßung erfolgte in einem ELISA - Fotometer in 96-Well-Platten nach der Zugabe von 200 µl Färbelösung zu 4 µl Probe. Die Eichkurve wurde mit BSA-Lösungen von 0.1 - 1.0 mg/ml in 150 mM NaCl bestimmt. Die Standardabweichungen betrugen bei Duplikaten oder Triplikaten im Meßbereich von 0.1 - 1.0 mg Protein/ml ca. 2-3 %.

3.9. Allgemeine Darstellung der verwendeten Trennmethoden für Proteine

3.9.1. Gelchromatographie

Bei Gelchromatographie oder Ausschluß-Chromatographie hat das in eine Säule gepackte Trenngel eine definierte Porengröße. Je kleiner Moleküle sind, desto weiter können sie in das Gel eindringen und desto größer wird ihr Laufweg durch die Säule. Stoffe, die größer als diese Poren sind, gelangen nicht in das Gel und haben deshalb einen kürzeren Laufweg. Folglich eluieren bei dieser Trennmethode Substanzen mit großem Molekulargewicht zuerst.

3.9.2. Ionenaustausch-Chromatographie

Ionenaustauscher sind inerte Stoffe, an die funktionelle Gruppen kovalent gebunden sind. Tragen diese Gruppen eine positive Ladung, dann konkurrieren Anionen durch elektrostatische Wechselwirkungen um diese Bindungsstellen (Anionenaustauscher). Ein gebundenes Substrat kann durch Stoffe höherer Bindungsstärke oder durch höhere Ionenstärke verdrängt werden. Ist das Substrat amphoter, wie z. B. Proteine, spielt der pH-Wert eine wichtige Rolle. Ein bei einem bestimmten pH-Wert negativ geladenes Protein verliert die Bindungsfähigkeit an einen Anionenaustauscher, wenn der pH-Wert unter den

isoelektrischen Punkt (pI) gesenkt und das Protein positiv geladen wird. Analog verhalten sich Kationenaustauscher bei umgekehrten Ladungsverhältnissen. Ein Trenneffekt wird also dann erzielt, wenn sich die gesuchte Substanz in ihrem Bindungsverhalten von den Begleitsubstanzen möglichst stark unterscheidet.

3.9.3. Affinitäts-Chromatographie

Affinitäts-Chromatographie beruht auf der spezifischen komplexen Bindung bestimmter Molekülstrukturen von Substraten an Liganden, die kovalent an eine inerte Matrix gekoppelt sind. Die Dissoziationskonstante von Substrat und Ligand sollte zwischen 10^{-4} und 10^{-8} M liegen, um einerseits eine gute Bindung zu gewährleisten, und andererseits eine Elution bei möglichst milden Bedingungen zu ermöglichen.

3.9.3.1. Procion Red-Agarose Chromatographie

Procion Red HE3B gehört zur Gruppe der Triazinyl-Farbstoffe und wurde von Baird et al. (1976), an Sephadex gekoppelt, zum ersten Mal als Ligand zur affinitätschromatographischen Reinigung von Proteinen eingesetzt. Im Unterschied zu hochspezifischen Bindungen, z.B. bei Antigen-Antikörper Komplexen, erkennen Farbstoffliganden oft ganze Stoffgruppen. So bindet Procion Red z.B. stärker an NADP-abhängige als an NAD-abhängige Dehydrogenasen (Watson et al., 1978). Im einzelnen muß die Bindungsfähigkeit von Substraten an Farbstoffligand-Säulen jedoch empirisch ermittelt werden. Wichtig ist auch der pH-Wert. So sollte eine Trennung in der Regel bei $\text{pH} \geq 7$ erfolgen, da im sauren Bereich aufgrund starker anionischer funktioneller Gruppen fast alle Proteine unspezifisch binden. Die Elution gebundener Stoffe kann durch zunehmende Konzentration von Salzen und/oder Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid erfolgen.

3.9.3.2. Con A-Sepharose Chromatographie

Concanavalin A (Con A) bindet α -D-Glucopyranosyl- und α -D-Mannopyranosyl-Reste. Entscheidend für die Komplexbildung ist die Konfiguration der Hydroxylgruppen an den Kohlenstoffatomen 3, 4 und 6. Die Hydroxylgruppe an C-2 trägt nur wenig zur Stärke der Bindung bei, bewirkt aber, daß die Affinität von Mannosyl-Gruppen größer als die von Glucosyl-Gruppen ist. Die Bindungsstärke nimmt deshalb mit folgender Reihe zu: D-Glucose < D-Mannose < α -Methyl-D-Glucosid < α -Methyl-D-Mannosid (Goldstein et al., 1965). Ist Con A an eine feste Matrix gekoppelt, können gebundene Glykoproteine mit diesen Reagenzien, die dann um die Bindungsstellen konkurrieren, graduell eluiert werden (Shore und Shore, 1973).

3.9.4. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die Nettoladung eines Proteins besteht aus der Summe der Ladungen der einzelnen Aminosäuren, aus denen dieses Protein zusammengesetzt ist. Die Ladungen der gebundenen sauren und basischen Aminosäuren sind gemäß der pK_s -Werte ihrer Seitenketten stark pH-abhängig. Da Proteine in der Regel amphotere Moleküle sind, haben sie bei einem bestimmten pH-Wert keine Nettoladung (isoelektrischer Punkt, pI). In einem elektrischen Feld entlang eines pH-Gradienten wandern die Proteine gemäß ihrer Nettoladung zu Anode oder Kathode, bis sie an ihrem pI fokussieren. Der pH-Gradient kann auf einfache Weise durch Ampholyte erzeugt werden, einem Gemisch aus vielen amphoteren Substanzen, die ihrerseits an ihren pI -Werten fokussieren und diese Bereiche stark puffern.

3.9.5. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Ab 0.023 % SDS ist bei einem Verhältnis SDS : Protein von ca. 1.4 : 1 (w/w) die Bindung von SDS an Proteine weitgehend abgesättigt (We-

ber und Kuter, 1971). Dabei werden die Proteinketten linearisiert und erhalten einen zu ihrer Größe proportionalen negativen Ladungsanteil. Disulfidbrücken, die intramolekular diese Linearisierung stören oder intermolekular Ketten miteinander verbinden, können durch Zusatz anderer Sulfide (2-Mercaptoethanol, Dithiothreitol, etc.) unter Bildung gemischter Disulfide aufgebrochen werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit zur Anode in einem Polyacrylamid-Gel hängt unter anderem von der Größe der Proteine und dem Vernetzungsgrad des Gels ab, aber aufgrund der SDS-Komplexierung nicht mehr von der Aminosäurezusammensetzung oder der nativen Konformation. Deshalb ist mit SDS-PAGE eine sehr genaue Molekulargewichtsbestimmung möglich. Falls der Erhalt biologischer Aktivität von Bedeutung ist, muß meistens auf die Reduktion mit Sulfiden verzichtet werden, wie z.B. bei Trennungen von IL-2 (Farrer und Fuller-Farrer, 1981) und IL-4 (Farrer et al., 1983).

3.10. Silanisieren von Glasplatten mit Dimethyldichlorsilan

Dimethyldichlorsilan reagiert bereits bei Raumtemperatur spontan mit Hydroxid- und Silanol-Resten unter Freisetzung von HCl. Derart behandelte Glasoberflächen werden durch die nach außen weisenden Methylgruppen stark hydrophob. Die Silanisierung von zwei gleich großen, mit Aceton gereinigten Glasplatten erfolgte mit 2% Dimethyldichlorsilan in Methylenchlorid (Radola, 1980) oder Chloroform. Einige ml der Lösung wurden im Abzug auf eine horizontal liegende Platte pipettiert und durch luftblasenfreies Auflegen einer zweiten Platte als dünner Film verteilt. Nach ca. 1 min wurden die Glasplatten wieder getrennt, luftgetrocknet und vorsichtig abgewischt. Die silanisierten Seiten konnte man wiederholt zum Abdecken von polymerisierenden Acrylamid-Gelen verwenden, um ein Anhaften der Gele an die Deckplatten zu vermeiden.

3.11. Ultradünne, rehydratisierbare Gele für IEF

3.11.1. Herstellung

Acrylamidlösung (5 % T, 3 % C):

destilliertes Wasser	6.1 ml
1 M Tris/HCl, pH 8.0	0.5 ml
30 % Acrylamid	1.7 ml
1 % N,N'-Methylenbisacrylamid	1.5 ml
5 % TEMED	60 µl
3 % $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Initialisierung)	167 µl

Ultradünne, rehydratisierbare Gele (ca. 120 µm dick) aus Polyacrylamid (Frey et al., 1986) wurden mit der Klapptechnik (Radola, 1980) hergestellt. Da Acrylamid kovalent auf eine speziell beschichtete Polyesterfolie (Gel-Fix für PAGE, 245 × 125 mm) polymerisierte, waren diese Gele einfach zu handhaben und änderten ihre Größe in gequollenem oder getrocknetem Zustand nicht. Zur Herstellung der Gele wurden Folien mit wenig Wasser luftblasenfrei auf 4 - 5 mm dicke Glasplatten gelegt, mit einem Gummiroller gleichmäßig festgedrückt und abgetrocknet. Zwei Lagen Tesa-Film ergaben eine Dicke von ca. 120 µm und bildeten, über die Längskanten der Folien geklebt (115 mm Abstand), die Höhe der Gießform. Nun wurden 5 ml Acrylamidlösung in die Mitte einer exakt horizontal liegenden Deckfolie in Längsrichtung einigermaßen gleichmäßig aufpipettiert und durch langsames Herunterklappen einer mit Dimethyldichlorsilan behandelten Glasplatte (Deckplatte, 245 × 125 × 4 mm) luftblasenfrei verteilt. Nach ca. 2 h war die Acrylamidlösung vollständig polymerisiert. Die Gele wurden 30 min in destilliertem Wasser gewaschen, um lösliche Verunreinigungen zu entfernen, 10 min in 10 % Glycerinlösung äquilibriert, über Nacht in vertikaler Lage bei Raumtemperatur getrocknet und nach Auflegen einer Gel-Fix Deckfolie bei 4°C aufbewahrt.

3.11.2. Rehydratisierung und Trennbedingungen

Anodenpuffer:

25 mM Asparaginsäure

25 mM Glutaminsäure

Kathodenpuffer:

25 mM Arginin

25 mM Lysin

2 M Ethylendiamin

Zur Rehydratisierung eines beliebigen Formats, ausgeschnitten aus einem vorgefertigten, getrockneten Gel, wurden $9 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ 3-5 % Servalyt auf eine Glasplatte pipettiert und das Gel aufgerollt, so daß sich die Flüssigkeit luftblasenfrei zwischen Gel und Glasplatte verteilte. Im Abstand von ca. 15 sec erfolgte ein Abheben und erneutes Aufrollen, gedreht um 90° , bis nach 1-2 min die gesamte Flüssigkeit absorbiert war. Nun wurde mit einer Radierklinge 5 mm Gel von jedem Rand der Polyesterfolie abgeschabt und die Folie mit einem dünnen, luftblasenfreien Film aus Wasser oder Kerosin zur besseren Wärmeableitung auf den Kühlblock einer horizontalen Elektrophorese-Kammer (LKB) gegeben. Die anschließend aufgelegten, mit Anoden- und Kathodenpuffer getränkten Elektrodenstreifen (5 mm breit) überlappten das Gel zur Hälfte. Während der Fokussierungen wurden die Platinelektroden mit 2 Glasplatten ($265 \times 125 \times 4$ mm) zusätzlich beschwert. Markerproteine (Protein-Testmischung 9, Serva) mit definierten isoelektrischen Punkten zeigten den Verlauf des pH-Gradienten.

3.11.3. Färbung mit Serva Violett (Radola et al., 1980)

Entfärbelösung: Methanol-Eisessig-Wasser 25:10:65 (v/v)

Färbelösungen:

Stammlösung: 1% Serva Violett 49 (oder 17) in Entfärbelösung

Gebrauchslösung: 0.2% Farbstoff durch Verdünnen der Stammlösung mit Entfärbelösung

Die Färbung erfolgte unter leichtem Schütteln in Glas- oder Plastikschalen:

- 5 min in 20 % Trichloressigsäure fixieren
- 10 sec mit Entfärbelösung waschen
- 5 min mit Gebrauchslösung färben
- 2-5 min mit Entfärbelösung mehrmals Waschen, bis der Hintergrund klar ist

3.11.4. Färbung mit Silbernitrat (Kinzkofer et al., 1983)

Silberdiamin-Lösung:

0.5 % $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	0.5 ml
175 mM NaOH	12 ml
Ethanol abs.	5 ml
AgNO_3	1.25 g in 25 ml H_2O
NH_3 (> 25 %)	3.5 ml

Die Reagenzien der Silberdiamin-Lösung wurden in der angegebenen Reihenfolge gemischt. Die Färbung erfolgte unter leichtem Schütteln in Glasschalen:

- 5 min in 20 % Trichloressigsäure fixieren
- 5-8 sec 0.01 % KMnO_4
- 2×10 sec 10 % Ethanol
- 2 min Silberdiamin-Lösung
- 5-15 sec 0.2 % Formaldehyd + 2 % K_2CO_3
- 30 sec 10 % Essigsäure

3.12. Herstellung granulierter Gele für präparative IEF

Die präparative IEF erfolgte in einem granulierten Gel (220 × 125 × 1 mm) in Längsrichtung (Frey und Radola, 1982). 2.6 g Sephadex IEF wurden nach 1 h Quellzeit in 200 ml destilliertem und entgastem Wasser durch dreimal Sedimentieren, Dekantieren, Resuspendieren

ausgiebig gewaschen, um lösliche Verunreinigungen zu entfernen, und zuletzt in wenig Wasser aufgenommen. So entstand eine dickflüssige Suspension, die nach Zugabe von 2.5 ml einer 40 % Lösung von Servalyt 3-10 (3 % Endkonzentration) auf eine mit einer Waage exakt horizontal ausgerichtete Glasplatte (265 × 125 × 1 mm) gegossen wurde. Das Gel wurde sofort mit einem Glasstab gleichmäßig verteilt, die Oberfläche durch leichte Bewegung der Glasplatte geglättet und mit einem Fön aus ca. 30 cm Entfernung so lange getrocknet, bis die Oberfläche matt war und an den Rändern leichte Risse entstanden. Nach Entfernung von ca. 2 cm Gel an jeder Breitseite mit einem Spatel wurden mit Elektrodenpuffer (siehe 3.11.2.) getränkte Elektrodenstreifen (10 mm breit) vorsichtig angedrückt und das Gel für 1 h bei 400 V und über Nacht für weitere 14 h bei 700 V präfokussiert (ca. 10200 Vh).

Unmittelbarer Probenauftrag ohne Präfokussierung ist bei diesen Gelen zwar möglich, hätte jedoch eine längere Verweilzeit der Proteine im Gel zur Folge. Die optimale Beladungskapazität beträgt 3-5 mg/ml Gelbettvolumen, kann aber auch gegebenenfalls 10-20 mg/ml betragen.

3.13. SDS - Polyacrylamidgele

3.13.1. Herstellung

3.13.1.1. Trenngele

Trenngele im Format 160 × 160 × 1.5 mm wurden nach einer modifizierten Methode von Laemmli (1970) mit konstantem Acrylamid-Gehalt und als Gradientengele von 7.5 - 18 % Acrylamid (exponentiell aus 3 % und 18 %-Lösungen oder linear aus 7.5 % und 18 %-Lösungen) gegossen. Die Gradienten bildeten sich durch Überschichtung, ausgehend von der hochprozentigen Acrylamidlösung, die in einer Misch-

kammer mit der niedrigprozentigen Lösung ständig verdünnt wurde, bei einer Einlaufgeschwindigkeit von 2.5 ml/min in die Gelkammer (BioRad). Tabelle 3.2 zeigt die Zusammensetzung der Gele bei verschiedenen Acrylamidkonzentrationen. Die einzelnen Komponenten wurden in der Reihenfolge der angegebenen Liste vermischt. Die Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat erfolgte zum Start der Polymerisation erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele. Danach wurden sie bis zum Gießen des Sammelgels überschichtet (Lösung S, 1:100).

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der Gele in Abhängigkeit verschiedener Acrylamidkonzentrationen. Alle Angaben sind in Volumen-Prozent.

Reihenfolge der Komponenten:

Wasser

37.5 % 1 M Tris/HCl, pH 8.8

Lösung A: 30 % Acrylamid

0.8 % N,N'-Methylenbisacrylamid (2.7 % C)

1.0 % Lösung S: 10 % SDS für reduzierende Gele

5 % SDS für nichtreduzierende Gele

Lösung T: 5 % TEMED (331 mM)

Lösung P: 3 % $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (131 mM)

Variable Komponenten in %:

Acrylamid (% im Gel)	Lösungen			
	Wasser	A	T	P
3	49	10	0.830	1.67
7.5	34.4	25	0.750	1.35
10	26.3	33.3	0.706	1.17
11	23.0	36.7	0.688	1.10
12	19.8	40	0.670	1.03
15	10.1	50	0.617	0.816
18	0.34	60	0.564	0.600

3.13.1.2. Sammelgel

Nach Gellierung des Trenngels wurde die überschichtete SDS-Lösung vorsichtig abgesaugt und das Sammelgel (3 % Acrylamid, pH 6.8) mit einem Kamm aus Polyethylen zur Bildung von Probestaschen aufpolymerisiert. Die folgende Liste zeigt die Zusammensetzung des Sammelgels, teilweise mit Lösungen aus Tabelle 3.2:

73.1 %	Wasser
12.4 %	1 M Tris/HCl, pH 6.8
10 %	Lösung A
1 %	Lösung S
1 %	Lösung T
0.5 %	Bromphenolblau, gesättigt in Wasser
2 %	Lösung P

3.13.2. Probenvorbereitung und Lauf

Aufschlußpuffer:	reduzierend	nichtreduzierend
1 M Tris/HCl, pH 6.8	650 µl	650 µl
10 % SDS	3 ml	250 µl
2-Mercaptoethanol	500 µl	-----
Glycerin	1 ml	1 ml
Wasser	ad 10 ml	ad 10 ml

Laufpuffer (pH 8.3):	reduzierend	nichtreduzierend
Glycerin	14.4 g	14.4 g
Tris	3.0 g	3.0 g
SDS	1.0 g	0.5 g
Wasser	jeweils ad 1 l	

3.13.3. Färben der Gele

Färbelösung: 0.9 g Serva Blau R-250
 46 ml Eisessig
 227 ml Isopropanol
 ad 500 ml Wasser

Entfärbelösung: 75 ml Eisessig
 50 ml Isopropanol
 ad 1000 ml Wasser

Nach ca. 30 min Färben der Gele unter leichtem Schütteln wurde alle 1-2 h die Entfärbelösung gewechselt, bis der Hintergrund klar war und das Gel bei Präzipitation des Farbstoffs gegebenenfalls mit Zellstoff vorsichtig abgewischt. Getrocknet wurde es bei Bedarf für 3 h bei 80°C im Wasserstrahlvakuum.

3.14. Partielle Reinigung von IL-3 an DEAE-Sephacel

IL-3 wurde aus WEHI-3B-CM mit DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie partiell gereinigt (Ihle, 1982) und die biologische Aktivität mit 32D cl.23 und L138.8A Zellen bestimmt. Dazu wurde 80-fach konzentriertes WEHI-3B-CM (YM10-Membran) durch Sephadex G-25 Gelfiltration in 50 mM Tris/HCl, pH 9.0 umgepuffert. Nach Applikation von 28 ml dieser Lösung in eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte DEAE- Sephacel Säule (2.5 x 22 cm, 16 ml/h Flußrate) folgte nach 50 ml Vorlauf ein linearer Gradient von 500 ml zu 400 mM NaCl in 50 mM Tris/HCl, pH 9.0. Die gesammelten 12 ml-Faktionen wurden durch 0.2 µm Membranen sterilfiltriert und durch Zugabe von 5 % zu 32D cl.23 Kulturen mit dem MTT-Test auf IL-3 Aktivität untersucht. Fraktionen mit mehr als 1 U/ml wurden gepoolt, erneut 30-50-fach konzentriert, durch Sephadex G-25 Gelfiltration in RPMI-1640 mit 5 % FCS überführt, sterilfiltriert und bei

-20°C aufbewahrt. Zur Verwendung von konstanten und maximal stimulierenden IL-3 Konzentrationen in MTT-Tests wurde eine entsprechende Verdünnung mit 100 U/ml in RPMI-1640 mit 5% FCS eingestellt und als IL-3-Standard zu 10% in Zellkulturen eingesetzt.

3.15. Partielle Reinigung von MEA

3.15.1. Kationenaustausch-Chromatographie (Schritt-1 Material)

Serumfrei konditioniertes und 8-fach konzentriertes SCM (YM10-Membran) wurde durch Sephadex G-25 Gelfiltration in Startpuffer überführt (20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 4.5) und auf S-Sepharose-Säulen aufgetragen, die mit demselben Puffer äquilibriert waren. Die Maße der verwendeten Säulen betrugen 16 × 380 mm für analytische oder 26 × 380 mm für präparative Zwecke. Die dazugehörigen Flußraten waren 20 oder 50 ml/h bei Fraktionsgrößen von 10 bzw. 12 ml. Nach 4 h Vorlauf mit Startpuffer folgte ein linearer Gradient (200 ml analytisch, 500 ml präparativ) bis die Konzentration des Elutionspuffers (1 M NaCl in 20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 4.5) erreicht war. Nach weiteren 3 h Elution war der Lauf beendet.

3.15.2. Präparative IEF von SCM

15 ml serumfrei konditioniertes SCM wurden 3 × 12 h bei 4°C gegen destilliertes Wasser dialysiert, lyophilisiert und in 1.5 ml 3% Servalyt 3-10 aufgenommen. Die Probe wurde im Abstand von 6-9 cm von der Anode und bis zu 1 cm vom Rand in 15 µl Portionen auf ein mit 3% Servalyt 3-10 präfokussiertes (ca. 10000 Vh) granuliertes Gel (220 × 125 × 1 mm) pipettiert. Die Auftragungspunkte hatten einen Abstand von ca. 7 mm und waren versetzt, so daß eine gleichmäßige Verteilung entstand. Bei ca. 9000 Vh wurde die Fokussierung gemäß dem unten dargestellten Protokoll beendet und das Gel in 5 mm

Abständen in 5 ml Polystyrol-Röhrchen gesammelt. Nach Elution mit 1.5 ml RPMI-1640, Zentrifugation (10 min, 1000 rpm) und Sterilfiltration des Überstandes standen die Fraktionen für biologische Tests zur Verfügung.

Fokussierungsprotokoll:

0.22 h	750 V	2.5 → 1.9 mA
1.0 h	4 W	1350 → 1510 V
0.92 h	6 W	1830 V
0.67 h	10 W	2300 V
1.17 h	18 W	2920 V
0.25 h	20 W	3050 V

3.15.3. Procion Red-Agarose Chromatographie (Schritt-2 Material)

Puffer I:	20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 4.5
Puffer II:	500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7.5
Puffer III:	1 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7.5
Puffer IV:	2 M Harnstoff, 1 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7.5
Puffer V:	2 M Harnstoff, 2 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7.5

Vorgereinigtes MEA der S-Sepharose Trennung (Schritt-1 Material) wurde über eine Amicon YM10-Membran ca. 10-fach konzentriert und mit 16 ml/h auf eine mit Puffer I äquilibrierte Red A Säule (15 × 180 mm) gegeben. Die Elution in 10 ml Fraktionen erfolgte mit 32 ml Puffer II, 96 ml Puffer III, 160 ml eines linearen Gradienten von Puffer III auf IV, und 100 ml Puffer V. Puffer V diente außerdem dazu, die Säule zu regenerieren und zu konservieren.

3.15.4. Con A-Sepharose Chromatographie (Schritt-3 Material)

Puffer I:	500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7.4
Puffer II:	100 mM Glucose, 500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7.4

Puffer III: 200 mM α -Methyl-D-mannosid, 500 mM NaCl,
20 mM Tris/HCl, pH 7.4

Puffer IV: 500 mM NaCl, 100 mM NaOAc/HOAc, pH 4.5

Puffer V: 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1 mM MnCl_2 , 1 M NaCl,
0.02 % Merthiolat, 100 mM NaOAc/HOAc, pH 6.0

MEA enthaltende Fraktionen der Procion Red-Agarose Trennung wurden durch G-25 Gelfiltration in Puffer I überführt und auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte Con A-Sepharose Säule (15 x 60 mm) gegeben. Während der Elution mit 20 ml Puffer I, 16 ml Puffer II und 24 ml Puffer III wurden 4 ml Fraktionen gesammelt. Durch Spülen mit 50 ml Puffer IV und 20 ml Puffer V konnte die Säule wieder regeneriert werden.

3.15.5. Gelfiltrationen

3.15.5.1. Sephadex G-100

5 ml serumfrei konditioniertes und 8-fach konzentriertes SCM wurden in einer Säule mit Sephadex G-100 superfine - Füllung (2.6 x 90 cm) aufgetrennt. Die Elution erfolgte entgegengesetzt zur Schwerkraft in MTPBS (siehe 3.6.1.) bei einer Flußrate von 7 ml/h. Die Fraktionsgröße betrug 5 ml.

3.15.5.2. TSK-250

Eine gegen Wasser dialysierte und gefriergetrocknete Probe von MEA (Schritt-2 Material) wurde in 100 μl MTPBS (siehe 3.6.1.) aufgenommen und über eine 7.5 x 300 mm HPLC-Säule mit TSK-250 Bio-Sil Füllung (BioRad) mit 1 ml/min aufgetrennt. Die Fraktionsgröße betrug 1 ml.

3.15.6. SDS - PAGE

10 ml Schritt-2 Material, gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert, wurden in 160 µl nichtreduzierendem Aufschlußpuffer (siehe 3.13.2.) aufgenommen, 2 h bei 37°C inkubiert und mit 3 × 50 µl in einem 10 % Gel bei 10°C für 15 h mit 80 V aufgetrennt. Vor der Färbung des Gels mit Coomassie Blau R wurden zwei dieser Bahnen abgetrennt und in 4 mm breite Streifen zerschnitten. Jeder Streifen kam zusammen mit 1 ml 5 % FCS in Wasser in einen vorbereiteten Dialysierschlauch (Visking) und dialysierte bei Raumtemperatur 12 h gegen MTPBS (siehe 3.6.1.), 12 h gegen 4 M Harnstoff, dann bei 4°C 2 × 12 h gegen RPMI-1640. Serum hatte die Aufgabe die Proteine zu stabilisieren und Harnstoff erleichterte während der Dialyse die Dissoziation der SDS/Protein-Komplexe, da sich SDS in biologischen Tests als äußerst toxisch erwies.

3.15.7. Analytische IEF in ultradünnen Gelen

Ausgangsmaterial für Fokussierungen von MEA in ultradünnen Gelen (120 µm) mit anschließenden biologischen Tests waren 2-3 ml Probe von Schritt-2 Material, die gegen Wasser dialysiert, lyophilisiert und in der zur Rehydratisierung verwendeten Lösung aufgenommen wurde.

3.15.7.1. Native Fokussierung

Die Fokussierung einer Probe (50 µl) erfolgte in einem mit 3 % Servalyt 3-10 rehydratisierten und präfokussierten (400 V, 100 Vh) Gel (60 × 60 mm). Die Probe wurde als 3 cm breiter Streifen 2 cm von der Anode aufgetragen, daneben zur Kontrolle je 2 × 1 µl Probe und pI-Marker. Nach der Fokussierung mit 1300 Vh bis zu einer Feldstärke von maximal 400 V/cm wurden die Kontrollbahnen abgeschnitten und mit Serva Violett bzw. Silbernitrat gefärbt. Das übrige

ge Gel wurde parallel zu den Elektroden in 5 mm Abständen in 10 Streifen geschnitten. Diese Gelstreifen wurden in je 1 ml RPMI-1640 mit 5 % FCS über 4 h bei 4°C eluiert und nach Sterilfiltration auf MEA - Aktivität getestet.

Präfokussierung:	15 min	400 V	
Probenauftrag:	50 µl		
Fokussierung:	10 min	400 V	
	10 min	0.4 W	1000 → 1400 V
	15 min	0.6 W	1660 → 1820 V
	10 min	0.8 W	2100 → 2180 V
	5 min	1.0 W	2420 → 2440 V

3.15.7.2. Fokussierung in Harnstoff

Ein 106 × 90 mm Gel rehydratisierte in 2.5 % Servalyt 3-10, 2.5 % Servalyt 6-9 und 4 M Harnstoff, und präfokussierte in Längsrichtung bei 15°C (500 V, 1000 Vh). 80 µl Probe wurden in zwei 4.5 cm breiten Streifen, 3 und 3.5 cm von der Anode entfernt, aufgetragen, daneben zur Kontrolle je 2 × 2 µl Probe und pl-Marker. Gemäß nachstehendem Protokoll fokussierte das Gel ca. 7500 Vh bei einer maximalen Feldstärke von 400 V/cm. Wie bei der nativen IEF wurden auch hier die Kontrollbanden mit Serva Violett 49 bzw. Silbernitrat gefärbt. Das restliche Gel wurde parallel zu den Elektroden mit 5 mm Abständen in 20 Streifen geschnitten, die in je 1 ml 5 % FCS in Wasser für 3 h bei Raumtemperatur eluierten. Der biologische Test erfolgte nach dem Umpuffern in RPMI-1640 durch Gelfiltration mit Sephadex G-25.

Präfokussierung:	120 min	500 V	
Probenauftrag:	80 µl		
Fokussierung:	je 30 min	500, 1000, 2000, 2500, 3000 V	
	je 15 min	3500, 4000 V	

3.16. Hitze - Behandlung von SCM

Die Temperaturempfindlichkeit der zu IL-3 synergistischen Aktivität in SCM wurde durch Inkubation dieses Mediums bei 37, 55, 60, 65, 70, 75 oder 80°C für jeweils 30 min ermittelt. Anschließend wurde SCM bei der Temperatur, die zur Inaktivierung ausreichte (75°C) für 5, 10, 15, 20 oder 30 min inkubiert.

3.17. Protease - Behandlung von MEA

Zur Untersuchung der Protease - Sensitivität von MEA wurden Proben von Schritt-1 Material nach bekannten Vorschriften (Bognacki et al., 1981) mit Trypsin und α -Chymotrypsin (Boehringer) verdaut. Da diese Proben auch IL-3 enthielten, bedeutete der Abbau von IL-3 eine zusätzliche Kontrolle für die Wirksamkeit der Proteasen.

200 μ l der Enzymlösungen (1 mg/ml Trypsin, 2 mg/ml α -Chymotrypsin) in MTPBS (siehe 3.6.1.) wirkte für 4 h bei 37°C auf 200 μ l gegen Wasser dialysierte, lyophilisierte und in MTPBS aufgenommene Proben. Als Negativkontrolle wurden 200 μ l Probe mit 200 μ l MTPBS identisch behandelt. 16 μ l einer 50 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) - Lösung in Isopropanol (2 mM Endkonzentration) stoppten die Reaktionen. Nach Zugabe von 100 μ l FCS wurden die Proben sterilfiltriert und biologisch getestet.

3.18. Partielle Reinigung von IL-2 und IL-4

EL-4-CM wurde unter denselben Bedingungen wie SCM durch S-Sepharose - Chromatographie aufgetrennt (siehe 3.15.1.). Die einzelnen Fraktionen wurden dann jeweils auf IL-2-, IL-3-, IL-4- und MEA - Aktivität untersucht.

4. ERGEBNISSE

4.1. Entdeckung von »mast cell growth enhancing activity« (MEA)

Bei der Untersuchung konditionierter Medien bezüglich einer proliferativen Wirkung auf IL-3-abhängige Mastzelllinien (siehe 2.2.1.1.) wurde ein deutlicher Unterschied zwischen SCM (siehe 3.3.1.) und WEHI-3B-CM (siehe 3.3.3.) festgestellt. Sättigende SCM-Konzentrationen zeigten im MTT-Test ein weit höheres Plateau als WEHI-3B-CM. Rekombinantes IL-3 (rIL-3) war ebenfalls weit weniger aktiv als SCM und mit der Wirkung mit WEHI-3B-CM vergleichbar (Abbildung 4.1).

Die Eigenschaft von SCM, die Proliferation der Mastzelllinien über die Plateau-Konzentration von rIL-3 zu stimulieren, deutete die Existenz eines weiteren Mastzell-Wachstumsfaktors in SCM an, der gemäß seiner biologischen Aktivität als »mast cell growth enhancing activity« (MEA) bezeichnet wurde.

Die aus der Literatur bekannte hohe Temperaturbeständigkeit von IL-3 (Bazill et al., 1983) ermöglichte eine selektive Hitzeinaktivierung von MEA in SCM (siehe 4.7.1.). Hitzebehandeltes SCM fiel in seiner biologischen Aktivität, die durch MTT-Test und ^3H -Thymidineinbau bestimmt wurde, auf das IL-3-Plateau ab, während bei genauso behandeltem IL-3 bzw. WEHI-3B-CM kein Aktivitätsverlust gegenüber den Mastzellen erkennbar war (Daten nicht gezeigt). Die Befunde, daß MEA selektiv inaktiviert werden konnte und auch nicht dialysierbar war (Ausschlußgröße ca. 10^4 kD), erhärteten die Vermutung eines weiteren, von IL-3 verschiedenen Wachstumsfaktors.

4.2. Untersuchung unspezifischer Einflüsse auf MEA-Effekte

Ein Vergleich von FCS-haltigem und serumfrei hergestelltem SCM ergab eine ca. 4-fach höhere MEA-Aktivität in serumfreiem (20 - 60 U/ml) gegenüber serumhaltigem SCM (3 - 15 U/ml). Es stellte sich

deshalb die Frage, ob die Supplemente BSA, Fe-Transferrin oder die Lipid-Emulsion, die als Serum-Ersatz (Iscoves et al., 1980) zugegeben wurden, oder aber residuales PWM für eine co-mitogene Stimulation der Mastzellen verantwortlich sein könnten. Verdünnungsreihen all dieser Komponenten sowie von dem Supernat Mitogen-frei konditionierter Milzzellen zeigten in MTT-Tests auf Mastzellen keine Wirkung und waren in Gegenwart sättigender IL-3 Konzentrationen weder synergistisch noch inhibitorisch. Damit ergab sich kein Anhalt für eine co-mitogene Wirkung der verwendeten Supplemente und kein inhibitorischer Effekt.

Ferner mußte ausgeschlossen werden, daß die mit SCM etablierten Linien nicht aus verschiedenen Populationen bestanden, wobei die einen nur IL-3 abhängig wuchsen, während die anderen nur auf einen Wachstumsfaktor aus SCM antworteten, der in WEHI-3B-CM nicht vorkam. Deshalb wurden die Linien in Soft-Agar kloniert (siehe 3.4.) und die einzelnen Klone auf ihre Responsivität gegenüber SCM und IL-3 untersucht. Von 21 getesteten Klonen fand sich kein einziger, der nicht auf IL-3 und nur auf SCM geantwortet hätte. Auch proliferierte keiner, der nur IL-3 sensitiv war. Alle Klone zeigten gegenüber SCM denselben Synergismus wie die Mutterlinie in Abbildung 4.1. Ein Hinweis auf eine Heterogenität in der proliferativen Antwort der verwendeten Targetzelllinie ergab sich somit nicht.

4.3. Untersuchung anderer Cytokine auf MEA-Effekte

MEA konnte als ein nicht dialysierbares (Ausschlußgrenze 10 - 15 kD) Protein (siehe 4.7.2. Protease-Test) identifiziert werden. Deshalb wurden alle bislang in der Literatur beschriebenen hämatopoetisch aktiven Cytokine auf MEA-Wirkung untersucht.

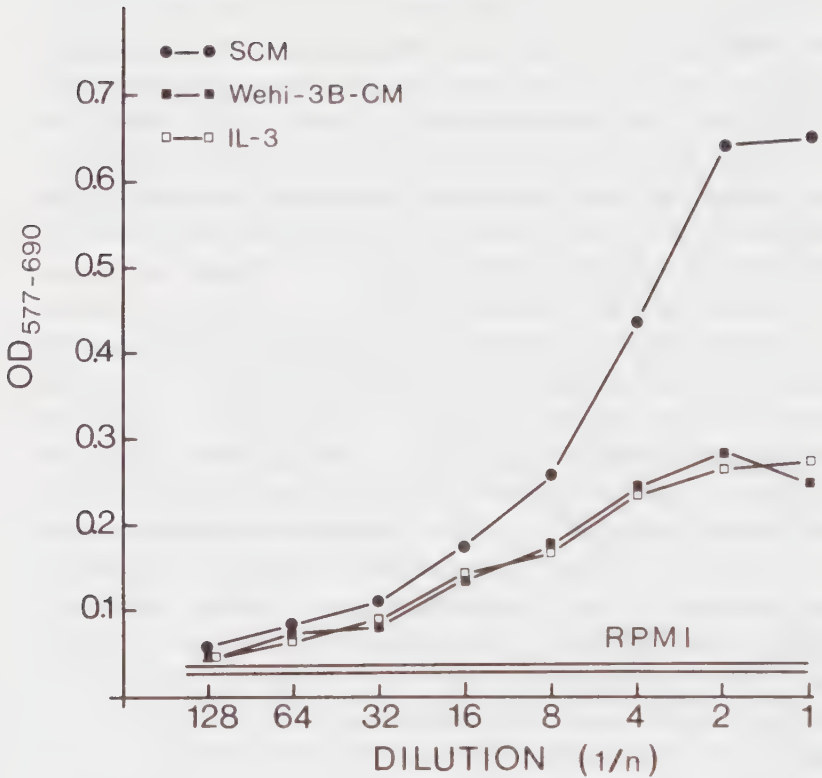


Abbildung 4.1: Vergleich der Proliferation der Mastzelllinie L167A (MTT - Test) nach seriell verdünnten Konzentrationen von SCM, WEHI-3B-CM und murIL-3. SCM bewirkt einen deutlich höheren MTT - Umsatz gegenüber der Plateau - Stimulation von IL-3 bzw. WEHI-3B-CM. Die jeweilige Ausgangskonzentration (1:1) betrug 20 % serumfreies SCM, 20 % WEHI-3B-CM bzw. 20 U/ml murIL-3.

4.3.1. Vergleich von MEA mit IL-4

Am ehesten schien eine Identität von MEA mit IL-4 möglich, da aus der Literatur bekannt wurde, daß IL-4 auf Mastzellen in Kombination mit IL-3 ebenfalls synergistisch wirkt (Smith und Rennick, 1986;

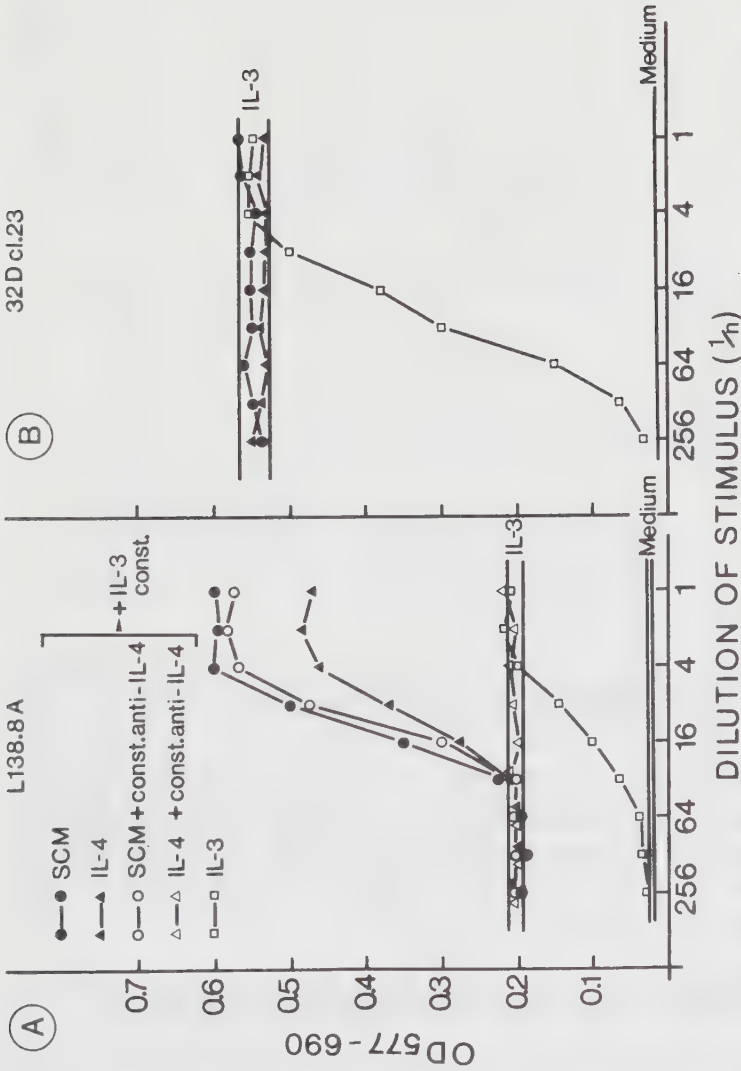


Abbildung 4.2: Vergleich der Mastzelllinie L138.8A (Bild A) mit der myeloischen Linie 32Dcl.23 (Bild B) hinsichtlich der Responsivität (MTT-Test) seriell verdünnter Konzentrationen von IL-4 bzw. SCM mit konstant IL-3. Nur bei L138.8A zeigte SCM bzw. IL-4 einen Synergismus mit IL-3 (10 U/ml). Anti-IL-4 Antikörper (10 % IIBI-CM) neutralisierte nur die synergistische Aktivität von IL-4, nicht jedoch die von SCM. Die jeweilige Ausgangskonzentration (1:1) betrug 40 % serumfreies SCM, 40 U/ml IL-3 bzw. 40 U/ml IL-4.

Mosmann et al., 1986). Auch die hier verwendeten Linien L138.8A und L167A zeigten diesen Synergismus. Jedoch konnte ein monoklonaler anti-IL-4 Antikörper, der vom 11B11-Hybridom stammte (Ohara und Paul, 1985), die verstärkende proliferative Wirkung von IL-4, nicht aber die von SCM neutralisieren. In Abbildung 4.2.A ist die Dosis-Wirkung von SCM und IL-4 bei sättigender IL-3 Konzentration ohne und mit anti-IL-4 dargestellt. Um die Wirksamkeit des Antikörpers zu demonstrieren, zeigt Abbildung 4.3 eine anti-IL-4 Verdünnung mit den jeweiligen Plateau-Konzentrationen (10 U/ml) an IL-4 oder MEA (hier Schritt-2 Material, siehe 4.6.2.) zusammen mit sättigendem IL-3 - Gehalt. Das eingesetzte anti-IL-4 Medium neutralisierte IL-4 noch bei einer Verdünnung von 1:16 maximal und bei 1:256 halbmaximal, während keine Wirkung auf MEA festzustellen war. Obwohl auch bei unterschiedlichem Bindungsverhalten des anti-IL-4 Antikörpers MEA immer noch ein höher glykosyliertes IL-4 sein konnte, wobei eine sterische Behinderung wichtiger Bindungsstellen durch den höheren Glykosylierungsgrad von MEA denkbar war, eröffnete der Einsatz dieses Antikörpers eine einfache Unterscheidungsmöglichkeit zwischen MEA und IL-4.

4.3.2. Vergleich von MEA mit weiteren Cytokinen

Außer IL-4 beeinflussten keine der in Tabelle 4.1 zusammengefaßten Cytokine entweder alleine oder in Kombination mit IL-3 die Wachstumsbedingungen der verwendeten Mastzelllinien. Somit schieden alle weiteren hämatopoetischen Wachstumsfaktoren einschließlich NGF hinsichtlich einer Identität mit MEA aus.

4.4. Responsivität von 32D cl.23 Zellen auf IL-3, IL-4 und MEA

Die Linie 32D cl.23 wuchs wie die Mastzelllinien L167A und L138.8A streng IL-3 abhängig, antwortete jedoch auf keine weiteren bekannten Wachstumsfaktoren. Weder IL-4 noch SCM wirkten in Gegenwart

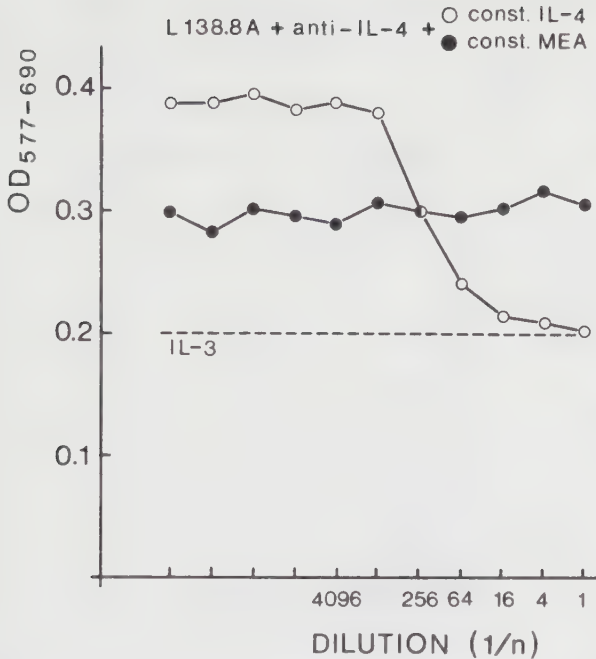


Abbildung 4.3: Responsivität der Linie L138.8A (MTT - Test) bei einer seriellen Verdünnung von monoklonalem anti-IL-4 Antikörper mit konstanten Mengen an IL-3 + IL-4 bzw. IL-3 + MEA. Die neutralisierende Wirkung des Antikörpers war nur bei IL-4 und nicht bei MEA zu beobachten. Die ca. 50 % ige Hemmung von IL-4 bei einer Verdünnung von 1:256 zeigt den hohen Titer des verwendeten anti-IL-4 - haltigen Mediums. Die Ausgangskonzentration (1:1) war 10 % 11B11-CM bei der Verdünnungsreihe des Antikörpers. IL-3, IL-4 bzw. MEA (Schritt-2 Material, siehe 4.6.2.) wurden jeweils zu 10 U/ml konstant zugegeben.

sättigender IL-3 Konzentrationen synergistisch, wie in Abbildung 4.2.B zu sehen ist. Auch ohne IL-3 hatte weder IL-4 noch MEA (Schritt-2 Material, siehe 4.6.2.) einen Einfluß auf die Proliferation dieser Zellen (Daten nicht gezeigt). Deshalb eignete sich diese Linie zum spezifischen IL-3 Nachweis im MTT-Test in Gegenwart von IL-4 oder MEA.

Tabelle 4.1: Proliferative Antwort der Mastzelllinien L138.8A oder L167A auf verschiedene konditionierte Medien oder Cytokine in An- oder Abwesenheit von IL-3.

Stimulus	maximale Konzentration	Sensitivität	
		- IL-3	+ IL-3
L929-CM (M-CSF)	25 %	-	+
PLAS (G-CSF)	25 %	-	+
WEHI-3B-CM	25 %	+	++
SCM	25 %	+++	+++
Epo	3 U/ml	-	+
mu GM-CSF	200 U/ml	-	+
hu rIL-1	100 U/ml	-	+
hu rIL-2	150 ng/ml	-	+
mu rIL-2	250 U/ml	-	+
mu IL-3	50 U/ml	+	+
mu rIL-4	250 U/ml	±	++
mu rIL-5	250 U/ml	-	+
mu IL-6	10 ⁵ U/ml	-	+
mu IFN-γ	10 ⁴ U/ml	-	±
hu TGF-α	50 ng/ml	-	+
hu TNF-α	20 nM	-	+
NGF	80 ng/ml	-	+
PWM	1:300	-	+

4.5. Partielle Reinigung von IL-3 aus WEHI-3B-CM durch Anionen- austausch - Chromatographie

Zur Identifizierung von Non - IL-3 - Aktivität war es notwendig, IL-3 sättigend zuzugeben, um eine Verstärkung der Proliferation feststellen zu können. Der Versuch, WEHI-3B-CM als IL-3 Quelle für MEA-Tests einzusetzen, scheiterte an einem Inhibitor im WEHI-3B-CM. Bei Verwendung von WEHI-3B-CM war keine synergistische Aktivität von MEA nachweisbar. Dies belegt Abbildung 4.4 mit Verdün-

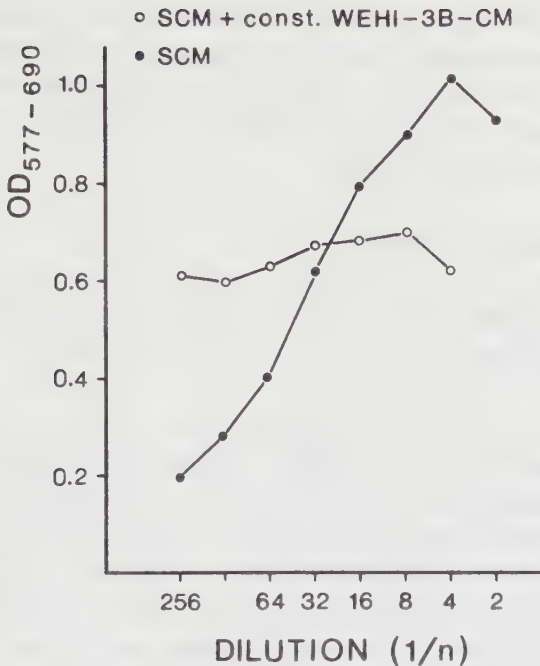


Abbildung 4.4: Responsivität der Linie L167A (MTT - Test) auf seriell verdünnte serumfreie SCM - Konzentrationen in An- und Abwesenheit von WEHI-3B-CM. WEHI-3B-CM, das konstant zu 10 % zugegeben wurde, inhibiert die synergistische Aktivität von SCM. Die Verdünnung von 1:1 entspricht 100 % SCM.

nungsreihen von SCM ohne und mit konstanten Mengen an WEHI-3B-CM. Zur Entfernung der inhibitorischen Aktivität wurde IL-3 aus WEHI-3B-CM durch DEAE-Sephacel Chromatographie partiell gereinigt. Das IL-3 Präparat, das aus allen Fraktionen mit mehr als 1 U/ml hergestellt wurde, wirkte nicht mehr hemmend. Der Inhibitor dürfte ein Molekulargewicht von mehr als 5 kD besitzen, da er im Durchlauf von Sephadex G-25 Gelfiltrationen zu finden war. Er eluierte bei hohen Salzkonzentrationen (2 M NaCl, 2 M Harnstoff) von der Säule, wurde aber in dieser Arbeit nicht näher biochemisch charakterisiert. Zur Klärung der Frage, ob dieser Inhibitor spezifisch in die Regulation

von Mastzellen eingreift, sind weitere Untersuchungen notwendig. Ein in diesem Zusammenhang interessantes Ergebnis ist, daß dieser Inhibitor zwar die Anwesenheit von MEA bzw. IL-4 bei Mastzellen maskierte, jedoch nicht die Responsivität der IL-4 - abhängig wachsenden T-Helfer-Linie F4/4K.6 reduzierte.

4.6. Partielle Reinigung von MEA

4.6.1. Trennung von MEA und IL-4 durch Kationenaustausch-Chromatographie (Schritt-1)

Durch die Trennung von 8-fach konzentriertem serumfreien SCM mittels S-Sepharose bei pH 4.5 wurde ein Großteil an Protein mit dem Durchlauf ausgewaschen, während IL-3 selbst und Aktivitäten, die in Mastzellkulturen mit IL-3 synergistisch wirken erst bei einem zusätzlichen NaCl-Gradienten eluierten. Der Verlauf der Trennung ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Eine bessere Auflösung des synergistischen Bereichs sowie die Proliferations-fördernde Aktivität der Fraktionen in Anwesenheit von anti-IL-4 Antikörper zeigt Abbildung 4.6.A. Deutlich ist zu erkennen, daß der zuletzt eluierte Peak (ab ca. 700 mM NaCl) vom Antikörper vollständig neutralisiert wurde. Der mit IL-3 kofraktionierende Bereich (ca. 360 - 650 mM NaCl) blieb jedoch unbeeinflusst. Ein Vergleich mit EL-4-CM, das IL-2, IL-3 und IL-4 enthielt und unter identischen Bedingungen aufgetrennt wurde, ist in Abbildung 4.6.B dargestellt (IL-2 Verlauf hier nicht gezeigt). Hier eluierte die mit anti-IL-4 neutralisierbare Aktivität deutlich getrennt von IL-3, während kein anti-IL-4 resistenter Bereich wie bei der SCM-Trennung vorhanden war.

Die Fraktionen wurden zusätzlich auch an CTLL-2, 7TD1 und FDC-P1 Zellen getestet, um den Verlauf von IL-2, IL-6 und GM-CSF zu verfolgen. Der Gehalt von IL-2 in 8-fach konzentriertem SCM war sehr gering (ca. 1.6 U/ml) und nach der Trennung nicht mehr nachzuweisen. Da die FDC-P1 Zellen auf GM-CSF, IL-3 und IL-4 antworteten,

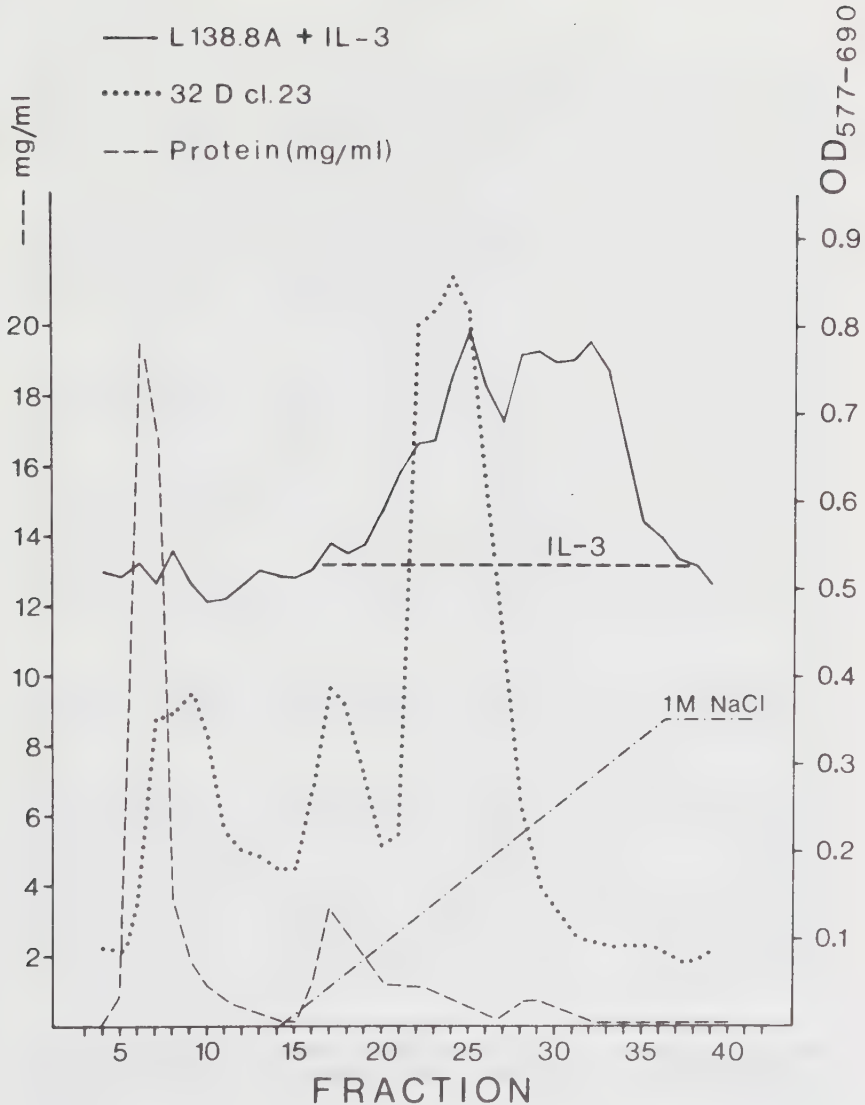


Abbildung 4.5: Darstellung der Trennung von SCM an S-Sepharose bei pH 4.5 und einem NaCl-Gradienten von 0-1 M (Schritt-1 Material). Der Großteil an Protein lief durch die Säule, während IL-3 (getestet an 32Dcl.23) und synergistische Aktivität (getestet an L167A mit konstant 10 U/ml IL-3) im Salzgradienten eluierten. Die einzelnen Fraktionen wurden mit Sephadex G-25 Gelfiltration umgepuffert und zu 20 % eingesetzt.

konnte der GM-CSF Gehalt in Gegenwart der anderen beiden Faktoren nur abgeschätzt werden. Zusätzlich zu den IL-3 und IL-4 Peaks war vor allem der Durchlauf für diese Linie aktiv. Deshalb kann man annehmen, daß damit ein Großteil an GM-CSF abgetrennt wurde. Das ist auch mit Daten aus der Literatur in Einklang zu bringen, da GM-CSF an Anionenaustauschersäulen bindet (Gordon und Guy, 1987) und deshalb schwach oder gar nicht an Kationenaustauscher binden sollte. IL-6 wurde an 7TD1 Zellen getestet und kofraktionierte zum Großteil mit MEA.

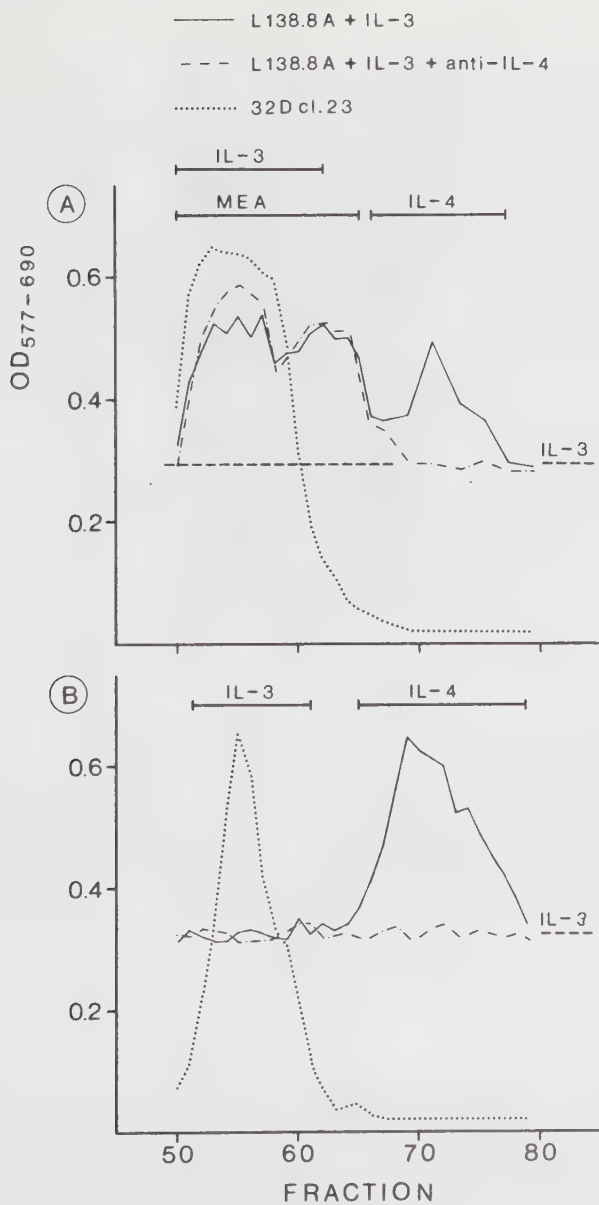
Zur Reinheitsprüfung wurden von fünf Fraktionen der OD₂₈₀ Peak - Bereiche gleiche Proteinmengen durch SDS-PAGE aufgetrennt. Wie aus Abbildung 4.7 zu sehen ist, ist BSA (Banden bei 66 kD) trotz seiner immensen Abtrennung im Durchlauf (Abbildung 4.5) dennoch über den gesamten Lauf verteilt.

Die S-Sepharose - Trennung ermöglichte eine ca. 17-fache Anreicherung von MEA bei 68 % Ausbeute an biologischer Aktivität.

4.6.2. Trennung von IL-3 und MEA durch Procion Red-Agarose Affinitäts-Chromatographie (Schritt-2)

Die MEA - haltigen Fraktionen der S-Sepharose Trennung wurden vereinigt, konzentriert, und bei dem pH-Wert des S-Sepharose Laufs (pH 4.5) auf eine Red A Säule gegeben. Da bei diesem pH die meisten Proteine unspezifisch an Procion Red Liganden binden, ließ sich diese Eigenschaft zum Beladen der Säule ausnutzen, ohne vorher den

Abbildung 4.6: Vergleich der für Mastzellen biologisch aktiven Bereiche von SCM (Bild A) und EL-4-CM (Bild B) nach Trennung an S-Sepharose unter identischen Bedingungen. Beide Supernate enthielten IL-3 (MTT - Test an 32Dcl.23) und für Mastzellen synergistische Aktivität (MTT - Test an L138.8A mit konstant 10 U/ml IL-3). Mit anti-IL-4 Antikörper (10 % 11B11-CM) ließ sich bei beiden Trennung nur der spät eluierende IL-4 - Bereich neutralisieren. MEA war in EL-4-CM nicht nachweisbar (Bild B), kofraktionierte bei der Trennung von SCM mit IL-3 und war gut von IL-4 abgetrennt (Bild A; Schritt-1 Material).



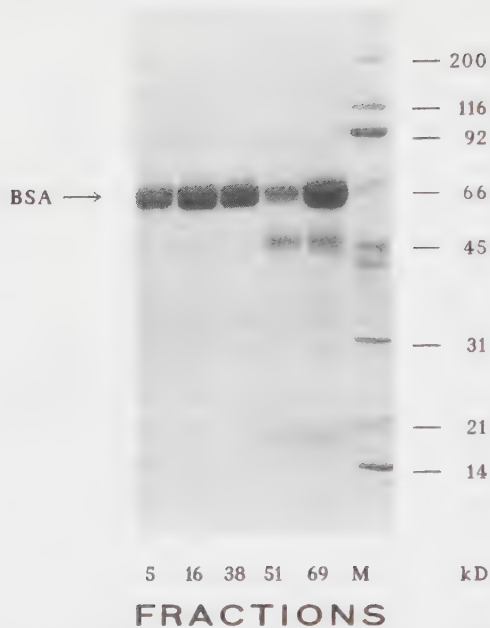
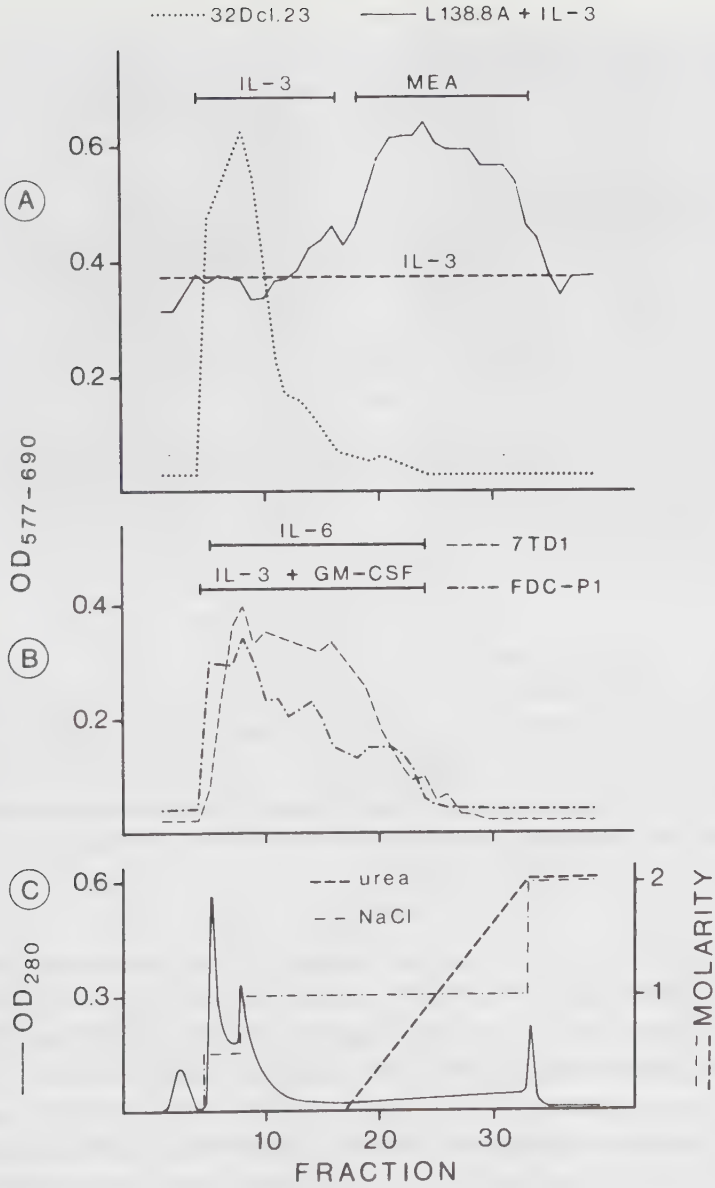


Abbildung 4.7: SDS - PAGE aller Protein - Peaks (OD_{280}) einer Trennung von SCM an S-Sepharose (Fraktionen 50 - 66: IL-3/MEA - Bereich; Fraktionen 68 - 78: IL-4 - Bereich). Pro Bahn wurden ca. 4 μ g Protein aufgetragen (M: Markerproteine). Die Banden bei 66 kD (Färbung mit Serva Blau R-250) zeigen, daß BSA trotz der enormen Abtrennung im Durchlauf (Abbildung 4.5.) immer noch das vorherrschende Protein in allen Fraktionen ist.

Abbildung 4.8: Darstellung der Trennung von Schritt-1 Material an Procion Red-Agarose (Schritt-2 Material). IL-3 (MTT - Test an 32Dcl.23) und MEA (MTT - Test an L138.8A) konnten gut voneinander separiert werden (Bild A). IL-6 (MTT - Test an 7TD1) und GM-CSF (MTT - Test an FDC-P1) konnten ebenfalls weitgehend von MEA abgetrennt werden (Bild B). Bild C zeigt die Elutionsbedingungen und den Proteinverlauf (OD_{280}) dieser Trennung.



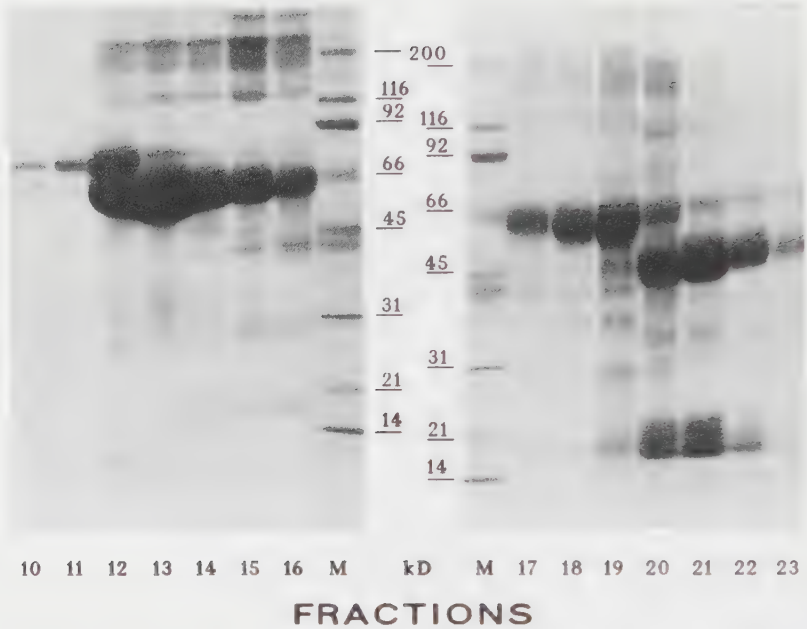


Abbildung 4.9: SDS - PAGE einzelner Fraktionen einer Trennung von MEA - Schritt-1 Material an Procion Red-Agarose (Fraktionen 12 - 18: IL-3 - Bereich; Fraktionen 20 - 23: MEA - Bereich). Pro Fraktion wurden 20 μ l aufgetrennt (M: 4 μ g Markerproteine). Der Proteinverlauf zeigt die vollständige Abtrennung von Transferrin (Bande bei ca. 80 kD von Fraktion 12) und die weitgehende Abtrennung von BSA (Banden bei ca. 66 kD der Fraktionen 12 - 19) vom MEA - Bereich.

Puffer des Ausgangsmaterials zu wechseln. Durch schrittweises Spülen der Säule mit 0.5 M und 1 M NaCl bei pH 7.5 eluierte neben dem Hauptanteil an Protein auch der größte Teil an IL-3 und IL-6. Die stufenweise Erhöhung der NaCl-Konzentration von 0.5 auf 1 M war notwendig, da bei unmittelbarer Spülung mit 1 M NaCl nach dem Einlauf ein beträchtlicher Anteil an MEA durch zu rasch eluierendes Protein mitgeschleppt wurde. Während eines Harnstoff-Gradienten von 0 - 2 M bei 1 M NaCl und pH 7.5 eluierte MEA gut ge-

trennt von IL-3 (Abbildung 4.8.A). Obwohl IL-6 und restliches GM-CSF durch die Ausläufer ihrer Peaks die MEA-Präparation noch teilweise kontaminierten (Abbildung 4.8.B), war das Hauptziel, die Separierung bekannter Mastzell-Wachstumsfaktoren (IL-3 und IL-4) von MEA erreicht. Dr. C.J. Sanderson (National Institute for Medical Research, London) fand in seinem Labor IL-5-Aktivität in SCM, konnte aber in dieser Schritt-2 Präparation eine IL-5 Aktivität ausschließen. Der Proteinverlauf und die Bedingungen der Trennung sind in Abbildung 4.8.C dargestellt.

Abbildung 4.9 zeigt den Proteinverlauf einer Trennung durch SDS-PAGE gleicher Volumina der einzelnen Fraktionen.

Ausgehend von Schritt-1 Material konnte MEA hier zusätzlich ca. 25-fach mit einer Ausbeute von 60 % angereichert werden.

4.6.3. Con A-Sepharose Affinitäts-Chromatographie von Schritt-2 MEA (Schritt-3)

Vereinigte MEA-haltige Fraktionen des Procion Red-Agarose Laufs wurden nach Umpuffern durch Sephadex G-25 Gelfiltration an einer Con A-Sepharose Säule getrennt. Die Säule wurde mit den Zuckerlösungen Glukose, Mannose, α -Methyl-D-glucosid und α -Methyl-D-mannosid nacheinander gespült, um durch steigende Elutionskraft die Bindungsstärke von MEA an Con A Liganden abzuschätzen. In Gegenwart von Glukose, dem schwächsten dieser Elutionsmittel eluierte MEA bereits fast vollständig. Abbildung 4.10 zeigt ein vereinfachtes Elutionsschema mit Glukose und α -Methyl-D-mannosid. Obwohl ca. 47 % an MEA zusammen mit über 95 % der Proteine im Durchlauf zu finden waren, weist der gebundene Anteil auf ein Glykoprotein hin, das mit vergleichsweise hoher Konzentration eluiert werden konnte.

Bei der Reinheitsüberprüfung durch SDS-PAGE (Abbildung 4.11) ist zu erkennen, daß eine neue, intensive Proteinbande in Durchlauf und Eluat der Con A-Sepharose Trennung erscheint. Die einzige Erklär-

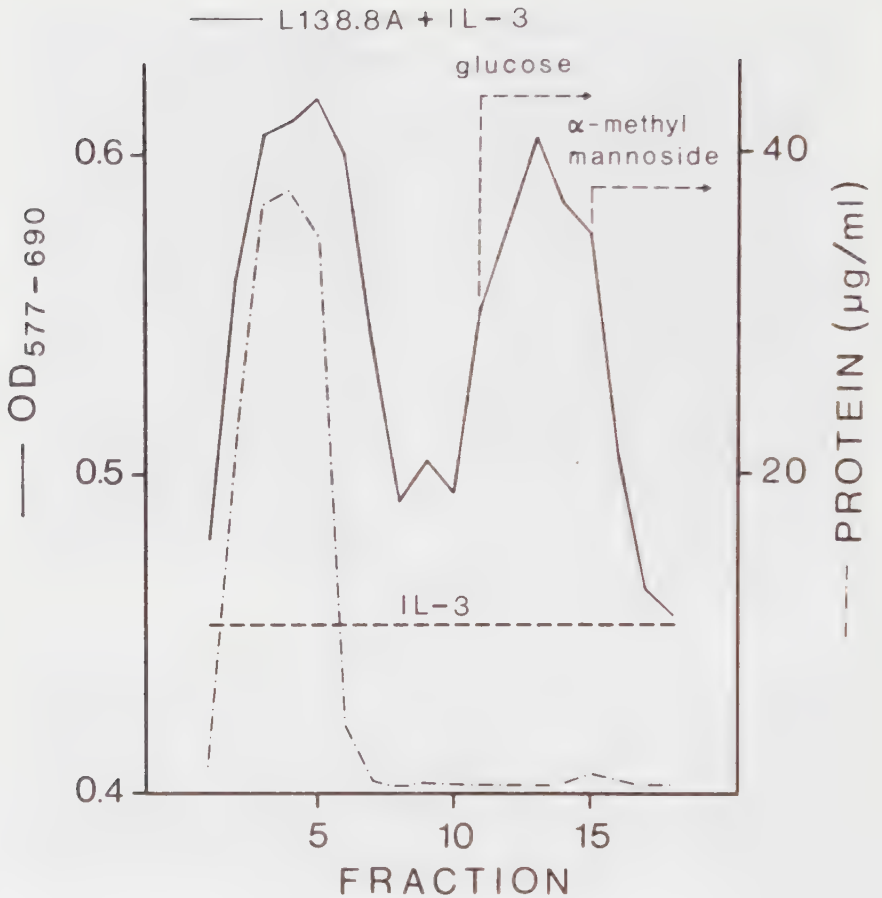


Abbildung 4.10: Darstellung der Trennung von Schritt-2 Material an Con A-Sepharose (Schritt-3 Material). Ca. 47 % an MEA - Aktivität (MTT - Test an L138.8A mit konstant 10 U/ml IL-3) war im Durchlauf, während ca. 42 % davon mit 100 mM D-Glucose, gefolgt von 200 mM Methyl- α -D-mannosid eluierte. Der Großteil der Proteine war hier im Durchlauf zu finden.

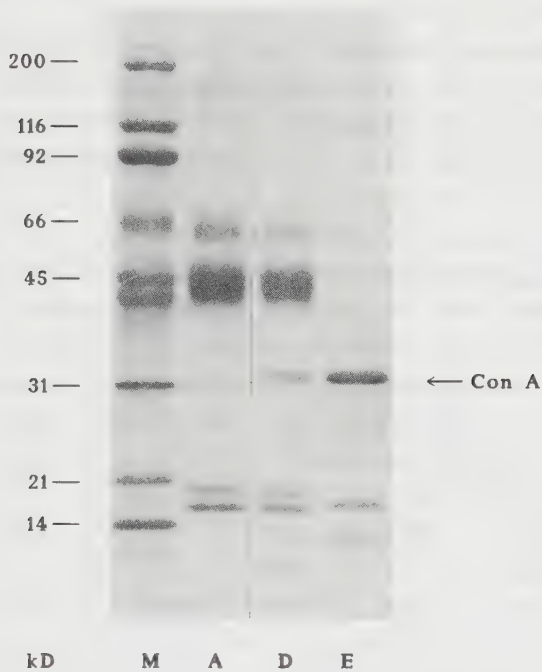


Abbildung 4.11: SDS - PAGE des Durchlaufs (D) und des Eluats (E) einer Trennung an Con A-Sepharose im Vergleich zum Ausgangsmaterial (A; Schritt-2 Material). Im Durchlauf und Eluat läßt sich eine zusätzliche Bande erkennen, die im Ausgangsmaterial nicht vorhanden war und anhand der Markerproteine (M) auf ca. 32 kD geschätzt werden kann. Die einzig mögliche Erklärung für das Auftauchen dieser Bande ist die Abdissoziation von Con A (monomer 26 kD; Cunningham et al., 1975) von der Säule. Beim Eluat ist Con A das vorherrschende Protein.

rung dafür ist, daß es sich hierbei um abdissoziiertes Con A von der Säule handelt. Auch das Molekulargewicht, dem diese Bande entspricht (ca. 32 kD), macht diese Annahme wahrscheinlich, da der Proteinanteil des Con A Monomeren 26 kD beträgt (Cunningham et al., 1975). Trotz des kontaminierenden Con A-Proteins konnte bei diesem

Schritt eine ca. 10-fache Anreicherung an MEA mit einer Ausbeute von 41 % erreicht werden.

Nach diesen drei Reinigungsschritten betrug die spezifische Aktivität von MEA ca. 8000 U/mg Protein, was einem Reinigungsfaktor von 4200 und einer Gesamtausbeute von 17 % entspricht. Die wesentlichen Daten dieser Trennungen sind in Tabelle 4.2 zusammengefaßt.

Tabelle 4.2: Reinigungstabelle von MEA nach S-Sepharose, Procion Red-Agarose und Con A-Sepharose Chromatographie

	Gesamt-Protein (mg)	MEA units	MEA units/mg Protein	Reinigungsfaktor	Gesamt-Ausbeute (%)
SCM (8-fach)	3000	5610	1.87	1	100
S-Sepharose	122.0	3815	31.3	16.7	68
Procion Red	2.9	2289	790	422	41
Con A-Sepharose	0.12	960	8000	4200	17

4.7. Biochemische Eigenschaften von MEA

4.7.1. Temperaturstabilität

MEA konnte durch eine 3-minütige Behandlung von SCM bei 100°C vollständig inaktiviert werden. Zur Optimierung der Hitzeinaktivierung unter möglichst schonenden Bedingungen wurde eine Temperatur- und Zeitkinetik erstellt. 20 min bei 75°C reichten zur vollständigen Inaktivierung von MEA aus. Es konnte problemlos wiederholt bei -20°C eingefroren und aufgetaut werden (Tabelle 4.3).

4.7.2. Protease - Empfindlichkeit

MEA von Schritt-1 Material konnte durch die Behandlung mit Chymotrypsin oder Trypsin vollständig zerstört werden. IL-3, das durch diese Proteasen ebenfalls verdaut wird, diente dabei als Kontrolle der Reaktionen. Als weitere Kontrolle wurde eine Probe ohne Proteasen identisch behandelt und genauso mit Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) versetzt, wie dies zur Inaktivierung der Enzyme geschah. Tabelle 4.3 zeigt einen Vergleich physikochemischer Stabilitäten von MEA und IL-3.

Tabelle 4.3: Physikochemische Stabilität von MEA und IL-3

Behandlung		Aktivität von IL-3 MEA	
-20°C (3 x)		+	+
37°C		+	+
75°C (20 min)		+	-
4h, 37°C:	PMSF	+	+
	Trypsin	-	-
	Chymotrypsin	-	-
7d, 4°C:	pH 7.0 (5 % FCS)	+	+
	pH 7.0 (proteinarm)	+	-
	pH 4.5 (proteinarm)	+	+
1d, 20°C:	4M Harnstoff	+	+
	1% SDS	+	+

4.7.3. Molekulargewicht

Das Molekulargewicht von MEA wurde durch Gelfiltrationen und nichtreduzierende SDS-PAGE bestimmt. Während die Gelfiltrationen

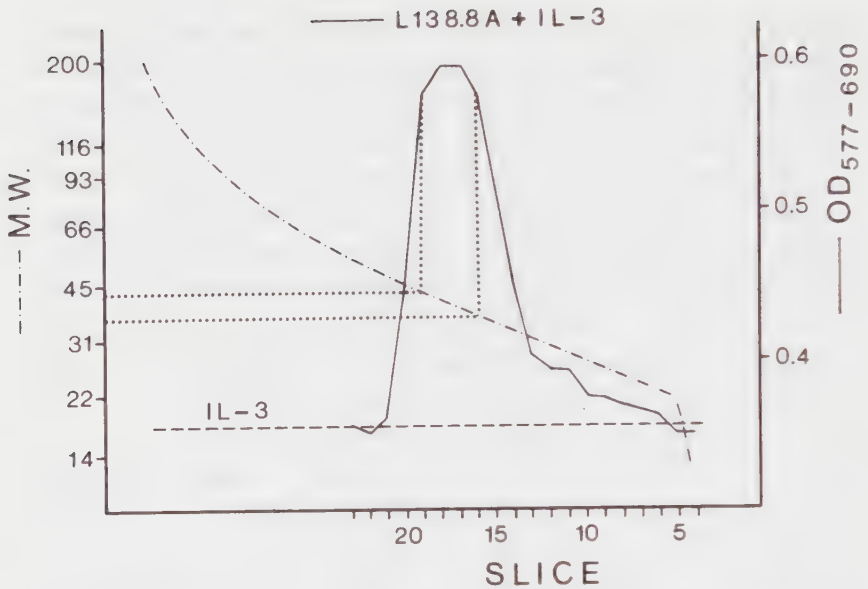


Abbildung 4.12: Darstellung der Trennung von Schritt-2 Material durch nichtreduzierende SDS - PAGE. MEA (MTT - Test an L138.8A mit konstant 10 U/ml IL-3) war im Bereich von 37 bis 44 kD nachweisbar.

einen relativ weiten Bereich ergaben, konnte die Untersuchung durch SDS-PAGE das Molekulargewicht am genauesten eingrenzen. Die Größe des Faktors schwankte bei den Gelfiltrationen von 25 bis 50 kD (SCM, getrennt an Sephadex G-100 superfine) und von 20 bis 38 kD (Schritt-2 Material, getrennt an einer TSK-250-HPLC - Säule; beide Trennungen nicht gezeigt). In Abbildung 4.12 ist der Verlauf in einem nichtreduzierenden SDS-Gel gezeigt. Die Molekülgröße lag im Bereich von 37 - 44 kD.

4.7.4. Isoelektrischer Punkt

Lyophilisiertes Schritt-2 Material wurde in einem ultradünnen Gel

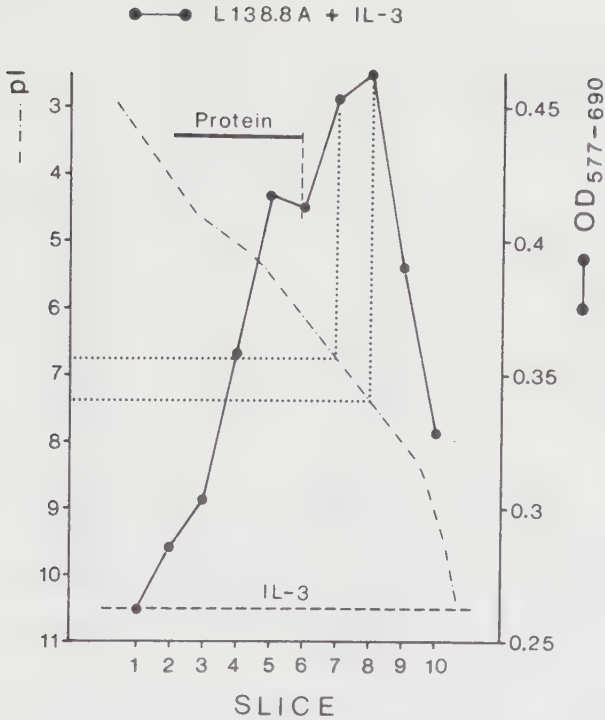


Abbildung 4.13: Darstellung einer nativen IEF von Schritt-2 Material im pI-Bereich von 3 - 10 in einem ultradünnen Gel (120 μ m). MEA (MTT-Test an L138.8A mit konstant 10 U/ml IL-3) fokussierte hauptsächlich im pI-Bereich 6.7 - 7.4 und war gut von allen sichtbaren Proteinen (Färbung mit Serva Violett 49 bzw. mit Silbernitrat) abgetrennt.

von pH 3 - 10 fokussiert. Dabei sammelte sich der Hauptteil an MEA zwischen pH 6.7 und 7.4, ein geringerer Anteil bei pH 5.6 (Abbildung 4.13). Trotz des relativ weiten pI-Bereichs, was auf Mikroheterogenität hinweist, war das meiste an biologischer Aktivität von nachweisbarem Protein (Silber-Färbung) abgetrennt (Abbildung 4.13). Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Fokussierung von SCM im granulierten Gel. Hier war jedoch keine Trennung von MEA, IL-3 und IL-4 möglich (Trennung nicht gezeigt).

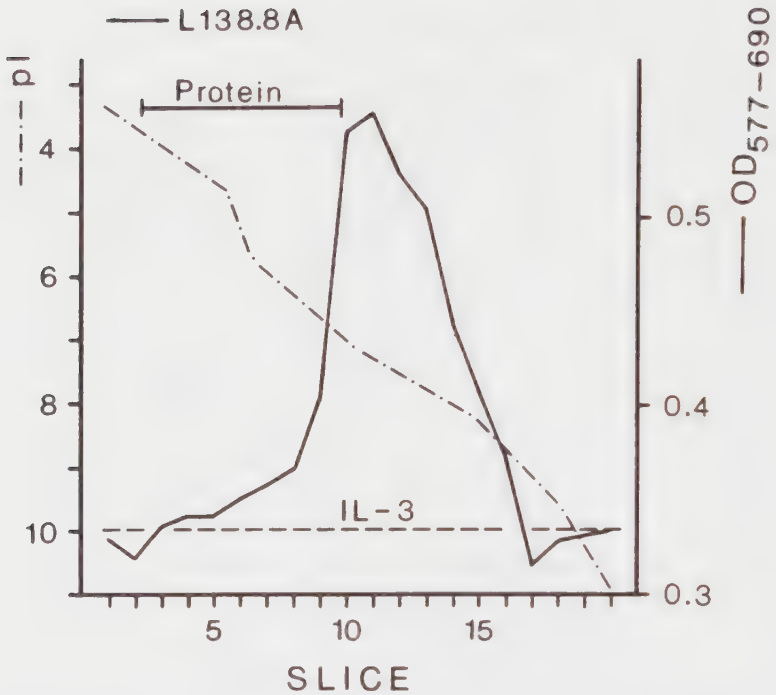


Abbildung 4.14: Darstellung einer IEF (120 μ m Gel) in 4 M Harnstoff von Schritt-2 Material im pI-Bereich von 3 - 10, der im Bereich von 6 - 9 gespreizt wurde. Beim Vergleich mit der nativen IEF (Abbildung 4.13) konnte MEA (MTT-Test an L138.8A mit konstant 10 U/ml IL-3) noch besser von kontaminierenden Proteinen abgetrennt werden.

Eine weitaus bessere Auflösung als unter nichtdenaturierenden Bedingungen ergab die Fokussierung in 4 M Harnstoff. Abbildung 4.14 zeigt den Verlauf dieser Trennung von Schritt-2 Material im ultradünnen Gel von pH 3 - 10 bei gleichzeitiger Spreizung des pH-Bereichs 6 - 9. MEA war vollständig getrennt von nachweisbarem Protein nach Färbung mit Serva Violett 49.

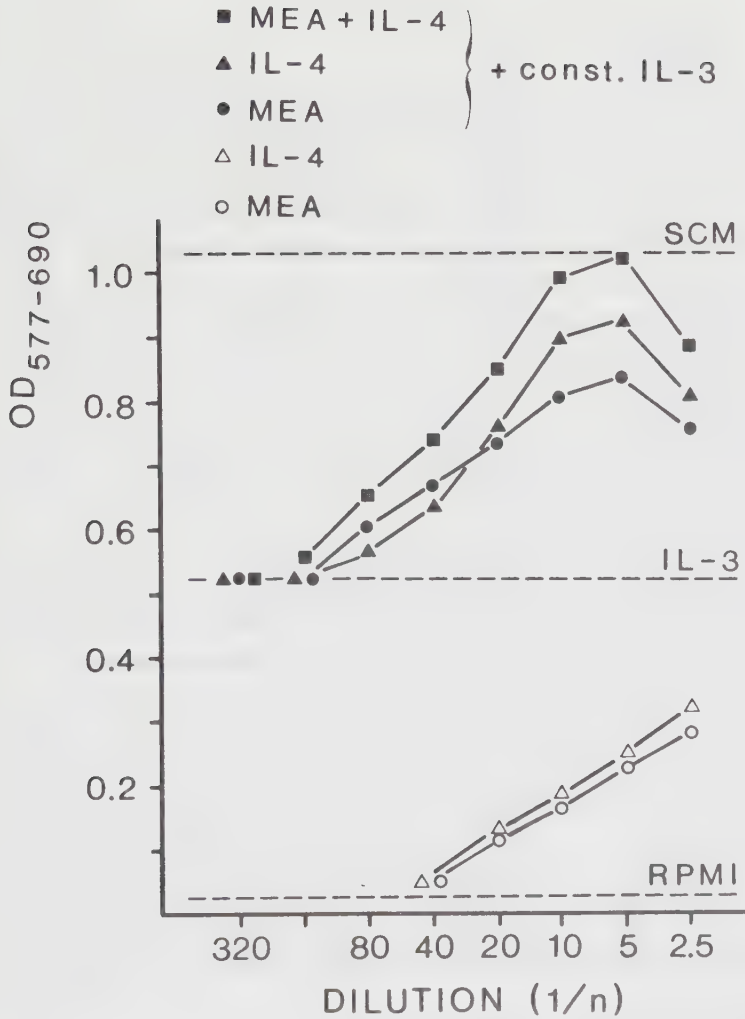


Abbildung 4.15: Vergleich der Proliferation der Mastzelllinie L138.8A (MTT - Test) nach seriell verdünnten Konzentrationen von MEA, IL-4 oder MEA + IL-4 bei konstanten Mengen an IL-3 (10 U/ml). Obwohl weder MEA noch IL-4 das Plateau von SCM erreichten und die synergistische Wirkung von IL-4 die von MEA übertraf, waren MEA und IL-4 zusammen so aktiv wie SCM. Ohne IL-3 waren MEA oder IL-4 nur wenig aktiv und erreichten bei den eingesetzten Mengen noch keine plateaustimulierende Wirkung. Eine Verdünnung von 1:1 entspricht 100 U/ml an MEA bzw. IL-4.

4.8. Biologische Wirkungen von MEA

Nach der Trennung von MEA von den anderen Mastzell-Wachstumsfaktoren konnte die Aktivität auf Mastzelllinien und andere Zelllinien getestet werden. Es zeigte sich, daß plateau-stimulierende Mengen an MEA in Abwesenheit von IL-3 alleine nur wenig wirksam waren. MEA verhielt sich in dieser Beziehung ähnlich synergistisch wie IL-4 (Abbildung 4.15). Deshalb lag es nahe, MEA und IL-4 an anderen Zelllinien zu vergleichen, von denen eine Responsivität gegenüber IL-4 bekannt war. CTLL-2 wächst streng IL-2 abhängig und antwortet nur marginal auf IL-4. F4/4K.6 dagegen kann sowohl mit IL-2 als auch mit IL-4 proliferieren. Aber weder CTLL-2 noch F4/4K.6 Zellen reagierten auf MEA, wie Abbildung 4.16 in einem Vergleich mit L138.8A demonstriert.

Eine charakteristische Eigenschaft von IL-4 ist die Expression von Ia-Antigenen auf unreifen B-Lymphozyten (Paul, 1987). W. Müller (Inst. für Genetik, Köln) konnte jedoch mit MEA (40 U/ml, Schritt-2 Material) keine Ia-Antigen - Expression auf B-Zellen induzieren.

E. Schmitt (Institut für Immunologie, Mainz) fand im konditionierten Medium der T-Helferlinie Mls 4.2 einen Wachstumsfaktor für eine andere T-Zelllinie (C1/9), der von IL-2 und IL-4 verschieden ist. Eine entsprechende Aktivität ist in Schritt-2 Material der MEA - Präparation zu finden und kofraktioniert mit diesem Material nach IEF in 4M Harnstoff, wie sie in Abschnitt 4.7.4. durchgeführt wurde. Über eine mögliche Identität von MEA mit diesem neu entdeckten T-Zell - Wachstumsfaktor kann noch keine Aussage gemacht werden.

4.9. MEA - Produktion durch Zelllinien

Bei der Untersuchung verschiedener etablierter Zelllinien auf MEA - Produktion wurden zwei positive Linien entdeckt. Ein dichter Zellrasen von 3T3-L1 - Fibroblasten synthetisierte in zwei Tagen geringe Mengen (1-2 U/ml) einer auf Mastzellen synergistisch wirkenden

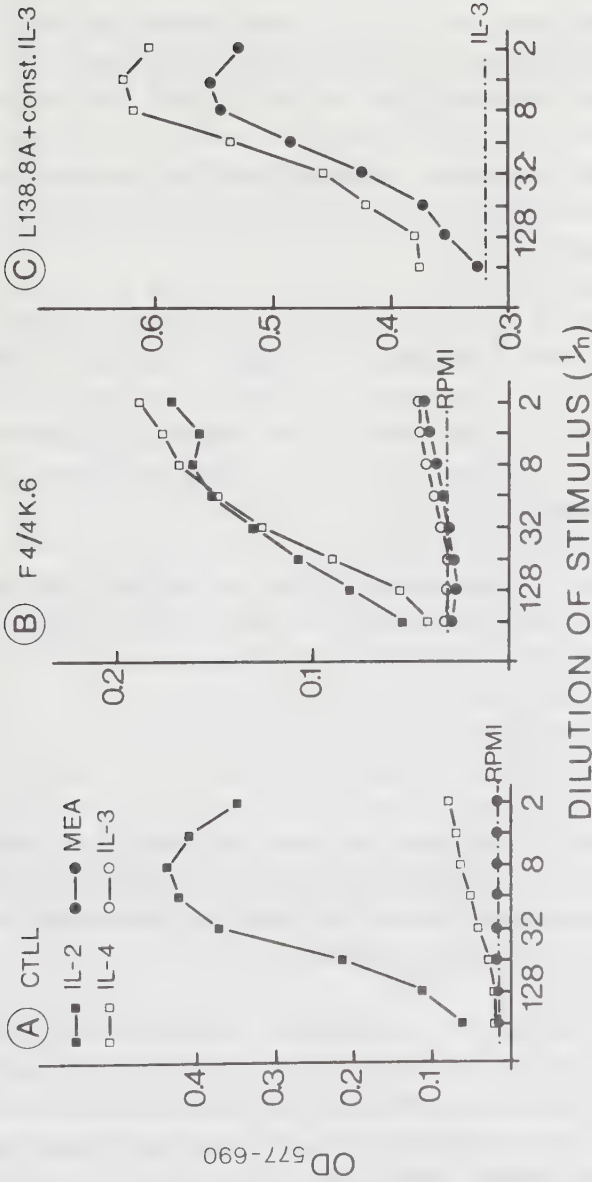


Abbildung 4.16: Vergleich der proliferativen Wirkung von MEA und IL-4 bei verschiedenen IL-4-sensitiven Zelllinien (MTT-Test). Bild A: Die zytotoxische Linie CTLL-2 wächst mit IL-2, antwortet nur marginal auf IL-4 aber nicht auf MEA. Bild B: Die T-Helferlinie F4/4K.6 wächst sowohl mit IL-2 als auch mit IL-4, antwortet aber ebenfalls nicht auf MEA. Bild C: Die Mastzelllinie L138.8A wird in Anwesenheit von IL-3 (hier 10 U/ml) von IL-4 oder MEA zu verstärkter Proliferation angeregt. Eine Verdünnung von 1:1 entspricht bei allen Faktoren 100 U/ml.

Aktivität, die nicht durch anti-IL-4 Antikörper hemmbar war (Abbildung 4.17). Da die Stimulation von Fibroblasten mit IL-1 die Produktion von Cytokinen induzieren kann (Lee et al., 1987; Yang et al., 1988), wurden 3T3-L1-Zellen auch mit IL-1 α inkubiert. Damit wurde zwar eine deutlich gesteigerte Produktion von IL-6 erreicht, der Gehalt an der MEA-ähnlichen Aktivität blieb jedoch unverändert (Daten nicht gezeigt).

Weitaus aktiver als SCM (20 - 60 U/ml) waren dagegen die konditionierten Überstände der T-Helfer Linie Mls 4.2. Nach allogener Restimulation mit bestrahlten Milzzellen (20 Gy) enthielt Mls 4.2-CM 2000 - 3000 U/ml einer MEA-ähnlichen Aktivität (Abbildung 4.17). Con A war ebenfalls in der Lage, diesen Faktor zu induzieren (500 - 1000 U/ml). Auch diese Aktivität war nicht durch anti-IL-4 Antikörper zu neutralisieren.

Obwohl die synergistische Aktivität aus Mls 4.2-CM dasselbe Trennprofil bei S-Sepharose Chromatographie zeigt wie MEA aus SCM, ist noch offen, ob der fragliche Faktor dieser Linie mit MEA identisch ist.

4.10. Ungeeignete Methoden für die Reinigung von MEA

Die Auswahl und Reihenfolge der einzelnen Schritte einer Proteinreinigung müssen bezüglich Anreicherungsfaktor und Ausbeute rein empirisch ermittelt werden. Deshalb wurden die folgenden Trennmethoden zwar durchgeführt, sie erwiesen sich aber aufgrund ungenügender Anreicherung oder zu hoher Verluste an MEA als ungeeignet:

Ammoniumsulfat - Fällung: Aus serumfreiem SCM, supplementiert mit BSA und Transferrin nach Iscove (1980), präzipitierten bis 50 % Ammoniumsulfat - Gehalt keine Proteine, während im Bereich von 50 - 80 % nahezu der gesamte Proteingehalt mit allen biologischen Aktivitäten ausfiel. Deshalb eignet sich diese Methode bestenfalls zum Konzentrieren des Ausgangsmaterials.

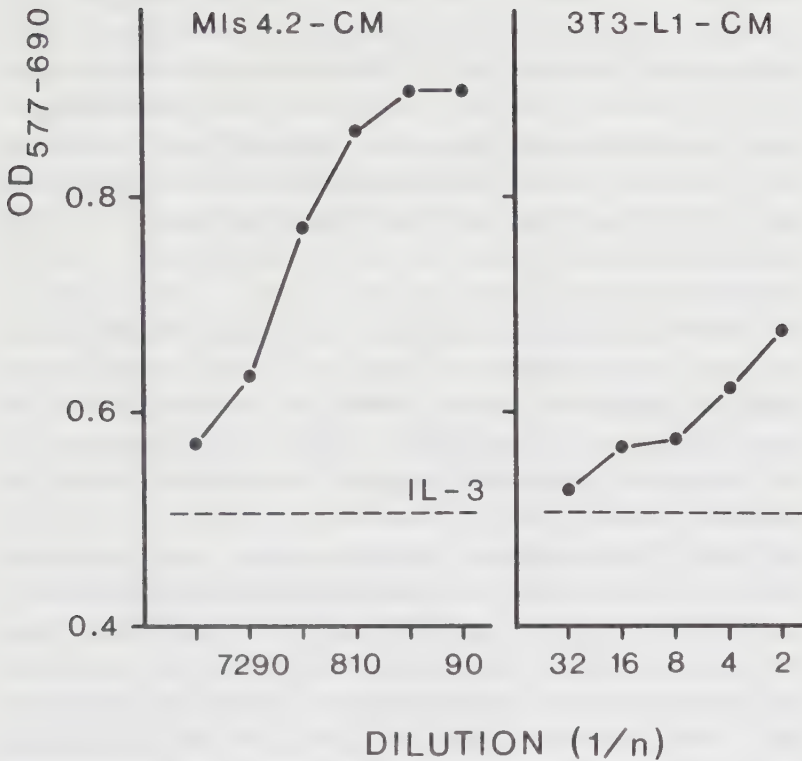


Abbildung 4.17: Vergleich der Produktion einer MEA - ähnlichen Aktivität der T-Helferlinie MIs 4.2 und der Fibroblastenlinie 3T3-L1 (MTT - Test an L138.8A mit konstant 10 U/ml IL-3). Aus der halbmaximalen Aktivität dieser Supernate ergaben sich ca. 1-2 U/ml an MEA - ähnlicher Aktivität in 3T3-L1-CM, während MIs 4.2-CM 2000-3000 U/ml dieses Faktors enthielt. Eine Verdünnung von 1:1 entspricht 100 % des konditionierten Mediums.

DEAE-Sephacel Anionenaustausch - Chromatographie: Zu IL-3 synergistische Aktivität ist bei pH 7.0 sowohl im Durchlauf als auch im Proteinhauptpeak während eines NaCl - Gradienten ungefähr gleich verteilt zu finden (Daten nicht gezeigt). Da zum Zeitpunkt dieser

Trennungen die biologische Aktivität von IL-4 auf Mastzellen noch nicht bekannt war und der anti-IL-4 Antikörper noch nicht zur Verfügung stand, kann über die IL-4/MEA - Verteilung keine Aussage gemacht werden. IL-3 und IL-4 sollten unter diesen Trennbedingungen jedoch im Durchlauf fraktionieren (Schmitt et al., 1987b). Da jedoch auch IL-3 mit einem Doppelpeak (Durchlauf/Proteinhauptpeak) eluierte, vermutlich durch teilweise Adhäsion an BSA, ist für MEA weder eine effiziente Trennung von der Hauptmenge an Protein noch von IL-3 und IL-4 zu erwarten.

Affinitätschromatographien an Blue A (Cibacronblau), Blue B, Green A und Orange A: Die Trenngele bestanden aus Farbstoffliganden, die an Agarose gekoppelt waren (Amicon, Witten). Bei allen diesen Farbstoffsäulen kofraktionierte synergistische Aktivität zum Großteil mit IL-3 und Fremdprotein entweder im Durchlauf (Blue B, Orange A) oder im Eluat mit 1.5 M NaCl (Blue A, Green A).

Hydrophobe Chromatographien an Oktylsepharose und Phenylsepharose: Bei den Trennungen von SCM durch abnehmende Ammoniumsulfat-Konzentration mit anschließendem Ethylen-Gradienten waren IL-3 und synergistische Aktivität trotz klarer Peaks bei OD₂₈₀ weitgehend über die gesamte Trennung verteilt. Obwohl der relativ hohe BSA - Gehalt aufgrund unspezifischer, hydrophober Wechselwirkungen mit den Cytokinen für die schlechte Auflösung verantwortlich sein konnte, wurde diese Methode auch nicht als ein möglicher weiterer Trennschritt verfolgt, da hier auch die Ausbeute an synergistischer Aktivität mit ca. 20 % extrem niedrig war.

5. DISKUSSION

Aus dem serumfreien Supernat Pokeweed - Mitogen stimulierter Milzzellen (SCM) der Maus konnte MEA, eine bislang noch nicht beschriebene, zu IL-3 synergistische Aktivität für Mastzellen unter Verwendung von Kationenaustausch - Chromatographie, Procion Red und Con A-Sepharose Affinitätschromatographie ca. 4200-fach angereichert werden (Tabelle 4.2). Es gelang die Abtrennung von IL-3 (Abbildung 4.8) und IL-4 (Abbildung 4.6), zwei anderen Mastzell - Wachstumsfaktoren, die in SCM nachgewiesen werden konnten (Hamaguchi et al., 1987). Ebenso war es möglich, GM-CSF und IL-6, zusätzliche biologische Aktivitäten im SCM, weitgehend von MEA abzutrennen (Abbildung 4.8). IL-5 war nach zwei Reinigungsschritten nicht mehr nachweisbar (siehe 4.8.). Aufgrund der Sensitivität gegenüber Trypsin und Chymotrypsin (Tabelle 4.3) und der teilweisen Bindung an Con A-Sepharose (Abbildung 4.10) konnte MEA als Glykoprotein identifiziert werden, das bei 75°C vollständig inaktiviert werden kann. Ein unterschiedlicher Glykosylierungsgrad, der bei anderen Cytokinen oft bis zu 40 % beträgt (Metcalfe, 1985), könnte auch für die unscharfen Bereiche bei Molekulargewicht (37-44 kD) und isoelektrischem Punkt (6.7 - 7.4) verantwortlich sein.

Beim Reinheitstest durch SDS-PAGE von Schritt-3 Material nach der Trennung an Con A-Sepharose zeigte sich, daß die nach optischer Schätzung am intensivsten gefärbten Bande, die auch im Durchlauf dieser Trennung zu sehen ist, abdissoziiertes Con A von der Säule war (Abbildung 4.11). Folglich könnte man mit dieser Methode einen noch besserern Reinigungsgrad erzielen, wenn sich das "Bluten" des Con A-Gels vermeiden ließe, indem Con A unter Verwendung nicht hydrolysierbarer Reagenzien kovalent an die Matrix gekoppelt wird. Eine Proteinbande im biologisch aktiven Bereich von MEA ist allerdings nicht zu erkennen. Nimmt man an, daß MEA bei ähnlich niedrigen Konzentrationen (10^{-11} - 10^{-13} M), wie sie für andere Cytokine gelten, biologisch wirksam ist, wäre die entsprechende Proteinmenge

im Gel auch viel zu gering, um sie durch Färbung sichtbar zu machen. Nach isoelektrischer Fokussierung von Schritt-2 Material unter nativen Bedingungen (Abbildung 4.13), vor allem aber in Anwesenheit von Harnstoff (Abbildung 4.14), sind auf analytischen Gelen ebenfalls keine Proteinbanden im biologisch aktiven Bereich von MEA erkennbar. Spezifische Aktivität und Reinigungsfaktor liegen nach den isoelektrischen Fokussierungen als dritten Trennschritt mit Sicherheit höher als nach der Chromatographie mit Con A-Sepharose. Die Abschätzung dieser Größen ließ sich jedoch mangels geeigneten Nachweises des Proteingehalts in den fokussierten Gelen nicht durchführen.

Weiterhin stellte sich heraus, daß MEA im pH-neutralen Bereich unter Protein-armen Bedingungen relativ instabil ist, da die biologische Aktivität bei pH 7.0 und 4°C oder -20°C innerhalb einer Woche verloren ging. Deshalb sollte eine isoelektrische Fokussierung für präparative Zwecke nur in einem gut präfokussierten Gel erfolgen, um die Verweildauer von MEA im neutralen Bereich möglichst kurz zu halten. Dagegen bleibt MEA bei pH 4.5 und -20°C unter denselben proteinarmlen Bedingungen über Monate gut stabil. Die Gründe für dieses Verhalten, einerseits die Stabilität gegenüber Harnstoff und SDS, andererseits die langsame Inaktivierung im neutralen Bereich, sind unklar.

Nach der Entdeckung der synergistischen Wirkung von IL-4 auf Mastzellen in Kombination mit IL-3 (Smith und Rennick, 1986; Mosmann et al., 1986) war es wichtig, die Identität von IL-4 und MEA auszuschließen. Dies konnte auf verschiedenen Wegen gezeigt werden:

1. MEA und IL-4 konnten mit chromatographischen Methoden voneinander getrennt werden.
2. Ein monoklonaler anti-IL-4 Antikörper (Ohara und Paul, 1985) war nicht in der Lage, die biologische Aktivität von MEA zu neutralisieren (Abbildung 4.3).

3. Zwei T-Zelllinien mit unterschiedlicher Responsivität gegenüber IL-4, die T-Helfer Linie F4/4K.6, die allein mit IL-4 proliferieren kann (Schmitt et al., 1987a), und die zytotoxische Linie CTLL-2, die nur marginal auf IL-4 antwortet, konnten beide nicht mit MEA stimuliert werden (Abbildung 4.16).
4. Eine verstärkte Expression von Ia-Antigenen auf unreifen B-Zellen, wie sie von IL-4 induziert wird (Paul, 1987), konnte von MEA nicht ausgelöst werden (siehe 4.8.).

Bei sättigenden IL-3 - Konzentrationen war das Plateau der Wirkung von MEA auf Mastzellen in den meisten Proliferationstests etwas geringer als das von IL-4. Ein noch höheres Plateau zeigte dagegen SCM. Die biologische Wirkung beider Faktoren scheint jedoch weitgehend additiv zu sein, da sie zusammen mit IL-3 das Plateau von SCM erreichten (Abbildung 4.15). Ohne IL-3 antworteten die Mastzellen auf MEA oder IL-4 wesentlich geringer als auf IL-3 allein, während zusammen mit IL-3 10 U/ml von MEA bzw. IL-4 zur maximalen Proliferation ausreichten, war bei 40 U/ml ohne IL-3 noch kein Plateau ihrer Aktivität festzustellen. (Abbildung 4.15). Die Stimulation von Mastzellen mit IL-4 bei wesentlich höheren Konzentrationen, als sie für den Synergismus mit IL-3 notwendig sind, wurde auch von Schmitt et al. (1987b) beobachtet.

Da ein Cytokin oft vielfältige Wirkungen zeigen kann (vergleiche die Tabellen 1.1 und 1.3), mußten zunächst weitere bekannte Wachstums- und Differenzierungsfaktoren untersucht werden, ob sie eine bislang nicht entdeckte Wirkung auf Mastzellen haben und MEA substituieren können.

Besonders bei Wurminfektionen sind erhöhte Zahlen von Mastzellen und Eosinophilen im mukosalen Gewebe des Intestinus charakteristisch (Newlands et al., 1984). Man könnte also gemeinsame humorale Regulatoren für beide Zelltypen erwarten. In diesem Zusammenhang mußte sich die Aufmerksamkeit auf IL-5 richten, das auch Proliferation und Differenzierung von Eosinophilen induziert (Warren

und Sanderson, 1985) und somit als gemeinsamer Regulator infrage kommen konnte. Jedoch stellte sich heraus, daß rekombinantes, murines IL-5 weder allein noch in Kombination mit IL-3 die Mastzelllinien zur Proliferation anregen konnte (siehe 4.3.2.). Auch besaß Schritt-2 MEA keine IL-5 Aktivität (siehe 4.8.).

Seit kurzem ist bekannt, daß Mastzellen einen engen Zell-zu-Zell-Kontakt mit Nervenzellen eingehen können, und daß NGF zusammen mit Phosphatidylserin bzw. Lyso-Phosphatidylserin Mastzellen zur Freisetzung von Histamin anregt (Bienenstock et al., 1987). Deshalb war auch eine proliferative Wirkung von NGF auf die verwendeten Mastzelllinien nicht auszuschließen. NGF zeigte hier jedoch keine MEA-ähnliche Wirkung (siehe 4.3.2.).

Ein Faktor, der für erhöhte Histamin-Konzentrationen in Kulturen aus Knochenmark verantwortlich und von IL-3 verschieden ist, wurde von Dy et al. (1986) beschrieben (HCSF: histamine-producing cell stimulating factor). Wegen der Bedeutung von Histamin für Mastzellen war der ursprünglich vermutete, mögliche Zusammenhang zwischen MEA und HCSF dadurch widerlegt, daß HCSF mit GM-CSF identisch ist (Minkowski und Dy, 1988).

Quesenberry et al. (1987) beschreibt ein weiteres Glykoprotein, das in synergistischer Weise zusammen mit IL-3, M-CSF oder GM-CSF auf Progenitoren aus Maus-Knochenmark die Bildung von Riesenzellkolonien in Agarkulturen stimuliert. Diese Aktivität wird von einer adhärenz Zelllinie produziert und hat ein Molekulargewicht von ca. 60 kD. Obwohl weitere biochemische Daten fehlen, ist allerdings aufgrund des relativ großen Unterschiedes im Molekulargewicht zu MEA hier eine Homologie eher unwahrscheinlich.

Es ist bekannt, daß Mastzellen in engem Kontakt zu adhärenz Zellrasen von Fibroblasten proliferieren können (Dayton et al., 1988; Levi-Schaffer et al., 1986). Der Zell-zu-Zell Kontakt ist dabei notwendig, da es nicht möglich ist, die Mastzellen allein mit dem konditionierten Medium solcher Fibroblastenlinien am Leben zu erhalten. Die murine Linie 3T3-L1 bestätigte diesen Befund, da sie ebenfalls

nicht in der Lage war, mit ihrem konditionierten Medium die Proliferation von Mastzellen zu unterhalten. Jedoch wurde in Kombination mit IL-3 die Proliferation der Mastzellen deutlich über das Sättigungs-Plateau von IL-3 erhöht. Die Konzentration dieser MEA-ähnlichen Aktivität war gering, betrug nur 1-2 U/ml, und konnte nicht durch anti-IL-4 Antikörper neutralisiert werden. Obwohl diese Linie nach Stimulation mit IL-1 α viel IL-6 produzierte, war die Konzentration der MEA-ähnlichen Aktivität nach IL-1 α -Induktion unverändert niedrig. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, daß im Gegensatz zur induzierbaren Freisetzung von IL-6 die Produktion dieser MEA-ähnlichen Aktivität bei 3T3-L1-Fibroblasten offensichtlich konstitutiv erfolgte.

Eine weitere MEA-ähnliche Aktivität fand sich im Überstand der Alloantigen-spezifischen T-Helfer Linie Mls 4.2 nach Restimulation. Diese Supernate waren bis zu 50-fach aktiver als SCM und enthielten ca. 3000 U/ml an synergistischer Aktivität, die nicht durch anti-IL-4 Antikörper neutralisiert werden konnte. Ferner enthielten sie noch IL-3 und IL-4. Eine Trennung an S-Sepharose ergab eine ähnliche Fraktionierung der biologischen Aktivitäten wie bei SCM.

Inwieweit die MEA-ähnlichen Substanzen aus 3T3-L1 und Mls 4.2 Supernaten zu MEA identisch sind, kann noch nicht gesagt werden. Jedoch ist bei dem Faktor der T-Zelllinie Mls 4.2 eine Homologie zu MEA sehr wahrscheinlich, da folgende Gemeinsamkeiten vorhanden sind:

1. Die synergistische Aktivität auf Mastzellen ist nicht durch anti-IL-4 Antikörper neutralisierbar.
2. Das Trennverhalten an S-Sepharose ist identisch mit dem von MEA.

Nach den vorliegenden Befunden ist anzunehmen, daß MEA ein neues, in der Literatur noch nicht beschriebenes Cytokin ist. Es ist von den in SCM nachweisbaren hämatopoetischen Faktoren IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 und GM-CSF verschieden, und seine biologische Aktivität

kann nicht durch Erythropoetin, IL-1 α , IL-2, G-CSF, M-CSF, IFN- γ , hu TGF- α , hu TNF- α und NGF ersetzt werden. Eine entgültige Aussage ist aber selbstverständlich erst möglich, wenn Teile der Proteinsequenz oder die Sequenz des codierenden Gens bekannt sind und diese mit bereits bekannten Sequenzen verglichen werden können. Mit Hilfe der Linie Mls 4.2, die zur Produktion eines MEA-ähnlichen Faktors stimuliert werden kann, bei dem es sich vermutlich um MEA handelt, könnte genügend Material zur Aufklärung der N-terminalen Sequenz zur Verfügung stehen, um mit Hilfe einer Auswahl an Nukleinsäure-Sequenzen das entsprechende Gen zu klonieren und zu identifizieren. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, ohne bekannte Proteinsequenz Klone aus einer cDNA-Bibliothek zu etablieren, die z.B. aus der RNA der Mls 4.2 Linie erstellt werden könnte. Die Identifizierung solcher Klone könnte mit geeigneten Expressionsvektoren durch in vitro-Translation und Nachweis der biologischen Aktivität erfolgen. Da Gene, die für Proteine mit Regulationsfunktionen codieren, in der Regel stark konserviert sind, besteht die Möglichkeit, daß die murine Gensequenz für MEA mit der entsprechenden humanen Sequenz hybridisiert, wie dies z.B. bei IL-4 der Fall ist (Yokota et al., 1986).

In vivo sind Mastzellen außer bei der Abwehr von Parasiten auch bei Entzündungen, Wundheilung und allergischen Reaktionen von Bedeutung. Bei Urtikaria pigmentosa findet man sie in erhöhter Konzentration in der Haut. Auch chronische Entzündungen, (z.B. Sklerodermie, Erythematodes und chronische Graft-versus-host-Krankheit) sind mit erhöhten Zahlen an Mastzellen verbunden (Claman, 1985). Während der Heilung von Wunden ist in der ersten bis zweiten Woche lokal scheinbar eine stark verminderte Mastzellzahl nachweisbar. Allerdings beruht dieser Effekt vermutlich nicht auf einer Auswanderung dieser Zellen, sondern auf ihrer Degranulation, da durch die übliche Nachweismethode mit Toluidinblau nicht die Mastzellen selbst, sondern nur die intakten Granula angefärbt werden können (Claman, 1985). Das durch Degranulation freigesetzte Histamin kann

das Wachstum von Fibroblasten stimulieren. Deshalb wird auch eine Beteiligung der Mastzellen bei der Bildung von Fibrosen vermutet, da sie in neugebildetem Gewebe ebenfalls in erhöhter Zahl vorkommen (Claman, 1985). Es gibt darüberhinaus Hinweise, daß Tumorigenese - Faktor, der für die Bildung neuer Blutgefäße verantwortlich ist, auch eine starke Reaktion von Mastzellen verursacht (Claman, 1985).

Die grundlegende Rolle der Mastzellen und Basophilen bei der Pathogenese allergischer Krankheiten beruht auf der übermäßigen Ausschüttung von vasoaktiven Aminen und Proteasen und der Synthese und Freisetzung von Prostaglandinen, Leukotrienen und PAF (platelet activating factor) (Marom und Casale, 1983). Der Mechanismus, der zur Ansammlung dieser Zellen am Ort der allergischen Reaktionen führt (z.B. den Nasenschleimhäuten bei Heufieber) ist noch unklar, da weder der IgE-Titer noch Chemotaxis eine ausreichende Erklärung bieten (Denburg et al., 1987). Trotz erhöhter Mastzellzahlen in den allergisch entzündeten Geweben wurde jedoch eine geringere Zahl an Progenitoren im peripheren Blut während der akuten Phase gefunden (Denburg et al., 1987). Dies läßt eine verstärkte Ausreifung der Mastzellen im akut entzündlichen Gewebe erwarten und bietet keinen Hinweis auf eine erhöhte Bildung von Progenitoren durch pluripotente Stammzellen. Welche Rolle MEA bei der Induktion dieser vielfältigen Wirkungen der Mastzellen spielt, muß durch weitere Untersuchungen gezeigt werden.

Zur Klärung der biologischen Fragen und zur Entwicklung eines schnellen und effektiven Reinigungsprotokolls von MEA, ist die Herstellung monoklonaler Antikörper vorgesehen, die die biologische Wirkung neutralisieren können, und die affinitätschromatographisch einsetzbar sind.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Aus murinem Knochenmark in vitro etablierte Mastzelllinien vom mukosalen Typ benötigen Interleukin 3 (IL-3) als essentiellen Wachstumsfaktor. Interleukin 4 (IL-4) wirkt zusammen mit IL-3 synergistisch auf diese Mastzellen, indem die Proliferationsrate, die durch IL-3 alleine bei sättigender Konzentration induziert wird, weiter zunimmt.

Im Überstand Pokeweed-Mitogen stimulierter muriner Milzzellen wurde eine weitere, von IL-3 und IL-4 verschiedene biologische Aktivität für diese Mastzelllinien entdeckt und partiell gereinigt. Da dieser Faktor die Proliferation der Zellen in Anwesenheit von IL-3 synergistisch verstärkt, wurde er als »mast cell growth enhancing activity« (MEA) bezeichnet.

MEA konnte von IL-3 und IL-4 durch Kationenaustausch-Chromatographie an S-Sepharose und Procion-Red Affinitätschromatographie vollständig abgetrennt werden. Dabei wurden auch IL-5 ganz, und IL-6 und GM-CSF zum größten Teil entfernt. Durch Con A-Affinitätschromatographie wurde insgesamt eine Anreicherung von ca. 4200-fach erzielt und eine spezifische Aktivität von 8000 U/mg Protein erreicht. Die Empfindlichkeit gegenüber Trypsin und Chymotrypsin und die Bindung an Con A charakterisiert MEA als ein Glykoprotein. Es wird bei 75°C thermisch inaktiviert, fokussiert im pH-Bereich von 6.7 - 7.4 und hat aufgrund nichtreduzierender SDS-PAGE ein Molekulargewicht zwischen 37 - 44 kD.

Weiterhin konnte ausgeschlossen werden, daß die murinen Cytokine IL-1, IL-2, G-CSF, M-CSF, IFN- γ und NGF, sowie hu TGF- α , hu TNF- α , Erythropoetin (von Mensch und Schaf) und Pokeweed-Mitogen keine MEA-ähnliche Wirkung auf Mastzellen induzieren können.

Diese Ergebnisse deuten an, daß es sich bei MEA um einen neuen, bislang noch nicht charakterisierten Wachstumsfaktor für Mastzellen handelt.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abrams, J.S. & Pearce, M.K. (1988)** Development of rat anti-mouse interleukin 3 monoclonal antibodies which neutralize bioactivity in vitro.
J. Immunol. 140, 131 - 139
- Askenase, P.W. & Van Loveren, H. (1983)** Delayed-type hypersensitivity: Activation of mast cells by antigen-specific T-cell factors initiates the cascade of cellular interactions.
Immunol. Today 4, 259 - 264
- Baird, J., Sherwood, R., Carr, R., & Atkinson, A. (1976)** Enzyme purification by substrate elution chromatography from Procion dye - polysaccharide matrices.
FEBS Lett. 70, 61 - 66
- Barrett, K.E. & Metcalfe D.D. (1984)** Mast cell heterogeneity: Evidence and implications.
J. Clin. Immunol. 4, 253 - 261
- Bartelmez, S.H. & Stanley, E.R. (1985)** Synergism between hemopoietic growth factors (HGFs) detected by their effects on cells bearing receptors for a lineage specific HGF: Assay of hemopoietin-1.
J. Cell. Physiol. 122, 370 - 378
- Bazill, G.W., Haynes, M., Garland, J., & Dexter, T.M. (1983)** Characterization and partial purification of a haemopoietic cell growth factor in WEHI-3B cell conditioned medium.
Biochem. J. 210, 747 - 759

- Becker, A.J., McCulloch, E.A., & Till, J.E. (1963)** Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells.
Nature 197, 452 - 454
- Bentley, S.A. (1981)** A close range cell: cell interaction required for stem cell maintenance in continuous bone marrow culture.
Exp. Hematol. 9, 305 - 312
- Bienenstock, J., Tomioka, M., Matsuda, H., Stead, R.H., Quinonez, G., Simon, G.T., Coughlin, M.D., & Denburg, J.A. (1987)** The role of mast cells in inflammatory processes: Evidence for nerve/mast cell interaction.
Int. Archs Allergy appl. Immun. 82, 238 - 243
- Bognacki J., Broxmeyer H.E., & Lobue J. (1981)** Isolation and biochemical characterization of leukemia-associated inhibitory activity that suppresses colony and cluster formation of cells.
Biochim. Biophys. Acta 672, 176 - 190
- Bond, M.W., Shrader, B., Mosmann, T., & Coffman, R.L. (1987)** A mouse T cell product that preferentially enhances IgA production.
J. Immunol. 139, 3691 - 3696
- Bradford, M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72, 248 - 254
- Bradley, T.R. & Metcalf, D. (1966)** The growth of mouse bone marrow cells in vitro.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44, 287 - 300

Burgess, A.W., Camakaris, J., & Metcalf, D. (1977) Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium.

J. Biol. Chem. 252, 1998 - 2003

Byrne, P.V., Guilbert, L.J., & Stanley, E.R. (1981) Distribution of cells bearing receptors for a colony-stimulating factor (CSF-1) in murine tissues.

J. Cell. Biol. 91, 848 - 853

Campbell, H.D., Ymer, S., Fung, M.C., & Young, I.G. (1985) Cloning and nucleotide sequence of the murine interleukin 3 gene.

Eur. J. Biochem. 150, 297 - 304

Campbell, H.D., Tucker, W.Q.J., Hort, Y., Martinson, M.E., Mayo, G., Clutterbuck, E.J., Sanderson, C.J., & Young, I.G. (1987) Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding human eosinophil differentiation factor (interleukin 5).

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6629 - 6633

Chen, M.G. & Schooley, J.C. (1968) A study of the clonal nature of the spleen colonies using chromosome markers.

Transplantation 6, 121 - 126

Claman, H.N. (1985) Mast cells, T cells and abnormal fibrosis.

Immunol. Today 6, 192 - 195

Clark, S.C. & Kamen, R. (1987) The human hematopoietic colony-stimulating factors.

Science 236, 1229 - 1237

Clark-Lewis, I. & Schrader, J.W. (1981) P-cell stimulating factor: Biochemical characterization of a new T cell-derived factor.

J. Immunol. 127, 1941 - 1947

- Clark-Lewis, I., Aebersold, R., Ziltener, H., Schrader, J.W., Hood, L.E., & Kent, S.B.H. (1986) Automated chemical synthesis of a protein growth factor for hemopoietic cells, interleukin-3.
Science 231, 134 - 139
- Crapper, R.M., Vario, G., Hamilton, J.A., Clark-Lewis, I., & Schrader, J.W. (1985) Stimulation of bone marrow-derived and peritoneal macrophages by a T lymphocyte-derived hemopoietic growth factor, persisting cell-stimulating factor.
Blood 66, 859 - 866
- Cunningham, B.A., Wang, J.L., Waxdal, M.J., & Edelman, G.M. (1975) The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. II. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragment F₃.
J. Biol. Chem. 250, 1503 - 1512
- Cutler, R.L., Johnson, G.R., & Nicola, N.A. (1985) Characterization of murine erythropoietin.
Exp. Hematol. 13, 899 - 905
- Das, S.K. & Stanley, E.R. (1982) Structure - function studies of a colony stimulating factor (CSF-1).
J. Biol. Chem. 257, 13679 - 13684
- Dayton, E.T., Pharr, P., Ogawa, M., Serafin, W.E., Austen, F., Levi-Schaffer, F., & Stevens, R.L. (1988) 3T3 fibroblasts induce cloned interleukin 3-dependent mouse mast cells to resemble connective tissue mast cells in granular constituency.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 569 - 572

- Denburg, J.A., Otsuka, H., Ohnisi, M., Ruhno, J., Bienenstock, J., & Dolovich, J. (1987) Contribution of basophil/mast cell and eosinophil growth and differentiation to the allergic tissue inflammatory response.
Int. Archs Allergy appl. Immun. 82, 321 - 326
- Dexter, T.M., Allen, T.D., & Lajtha, G. (1977a) Conditions controlling the proliferation of hematopoietic stem cells in vitro.
J. Cell. Physiol. 91, 335 - 344
- Dexter, T.M., Moore, M.A.S., & Sheridan, A.P.C. (1977b) Maintenance of hemopoietic stem cells and production of differentiated progeny in allogeneic and semi-allogeneic bone marrow chimeras in vitro.
J. Exp. Med. 145, 1612 - 1616
- Dexter, T.M., Garland, J.M., Scott, D., Scolnick, E., & Metcalf, D. (1980) Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines.
J. Exp. Med. 152, 1036 - 1047
- Dexter, T.M., Heyworth, C., & Spooncer, E. (1985) Studies on the self-renewal and differentiation of stem cells in long term marrow cultures. In: Cronkite E.P. (Ed.) Hematopoietic stem cell physiology, A.R. Liss, Inc., New York, S. 235 - 246
- Dy, M., Lebel, B., Kamoun, P., & Hamburger, J. (1981) Histamine production during the anti-allograft responses. Demonstration of a new lymphokine enhancing histamine synthesis.
J. Exp. Med. 153, 293 - 309

- Dy, M., Lebel, B., & Schneider, E. (1986) Histamine-producing cell stimulating factor (HCSF) and interleukin 3 (IL 3): Evidence for two distinct molecular entities.
J. Immunol. 136, 208 - 212
- Ehlich, P. (1879) Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten.
Arch. Anat. Physiol. 3, 166 - 169
- Enerbäck, L. (1981) The gut mucosal mast cells.
Monogr. Allergy 17, 222 - 232
- Enerbäck, L. (1987) Mucosal mast cells in the rat and in man.
Int. Archs Allergy appl. Immun. 82, 249 - 255
- Farrer, J.J. & Fuller-Farrer, J. (1981) Progress in the purification of murine thymoma-derived interleukin-2. In: Goldstein, A.L. und Chirigos, M.A. (Ed.) Lymphokines and Thymic Hormones: Their Potential Utilization in Cancer Therapeutics, Raven Press, New York.
- Farrer, J.J., Howard, M., Fuller-Farrer, J., & Paul, W.E. (1983) Biochemical and physicochemical characterization of mouse B cell growth factor: A lymphokine distinct from interleukin 2.
J. Immunol. 131, 1838 - 1842
- Fibbe, W.E., Van Damme, J., Billiau, A., Goselink, H.M., Voogt, P.J., Van Eeden, G., Ralph, P., Altrock, B.W., & Falkenburg, J.H.F. (1988) Interleukin 1 induces human marrow stromal cells in long-term culture to produce granulocyte colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor.
Blood 71, 430 - 435

- Finkelman, F.D., Katona, I., Urban, J.F., Jr., Snapper, C.M., Ohara, J., & Paul, W.E. (1986) Suppression of in vivo polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the lymphokine BSF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9675 - 9678
- Fletcher, M. & Gershwin, E. (1983) Insight into mast cell biology and IgE production. *Immunol Today* 4, 305 - 306
- Foreman, J.C. (1987) Substance P and calcitonin gene-related peptide: Effects on mast cells and in human skin. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 82, 366 - 371
- Fowler, J.H., Wu, A.M., Till, J.E., McCulloch, E.A., & Siminovitch, L. (1967) The cellular composition of hemopoietic spleen colonies. *J. Cell. Physiol.* 69, 65 - 72
- Frey, M.D., Kinzkofer, A., Atta, M.B., & Radola, B.J. (1986) Preparation of rehydratable polyacrylamide gels and their application in ultrathin-layer isoelectric focusing. *Electrophoresis* 7, 28 - 40
- Frey, M.D. & Radola, B.J. (1982) High resolution preparative isoelectric focusing in layers of granulated gels. *Electrophoresis* 3, 216 - 226
- Friedmann, R.M. & Vogel, S.N. (1983) Interferons with special emphasis on the immune system. *In: Dixon, F.J. & Kunkel, H.G. (Ed.) Advances in Immunology*, Vol. 34, S. 97 - 140, Academic Press,
- Fung, M.C., Hapel, A.J., Ymer, S., Cohen, D.R., Johnson, R.N., Campbell, H.D., & Young, I.G. (1984) Molecular cloning of cDNA for murine interleukin 3. *Nature* 307, 233 - 237

Gasson, J.C., Weisbart, R.H., Kaufman, S.E., Clark, S.C., Hewick, R. M., Wong, G.G., & Golde, D.W. (1984) Purified human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Direct action on neutrophils.

Science 226, 1339 - 1342

Gibson, S. & Miller, H.R.P. (1986) Mast cell subsets in the rat distinguished immunohistochemically by their content of serine proteinases.

Immunology 58, 101 - 104

Gillis, S. & Smith, K.A. (1977) Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells.

Nature 268, 154 - 156

Ginsburg, H. & Sachs, L. (1963) Formation of pure suspension of mast cells in tissue culture by differentiation of lymphoid cells from mouse thymus.

J. Natl. Cancer Inst. 31, 1 - 39

Goldstein, I.J., Hollerman, C.E., & Smith, E.E. (1965) Protein-carbohydrate interaction. II. Inhibition studies on the interaction of concanavalin A with polysaccharides.

Biochemistry 4, 876 - 883

Gough, N.M., Metcalf, D., Gough, J., Grail, D., & Dunn A.R. (1985) Structure and expression of the mRNA for murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor.

EMBO J. 4, 645 - 653

- Gray, P.W., Leung, D.W., Pennica, D., Yelverton, E., Najarian, R., Simonsen, C.C., Derynck, R., Sherwood, P.J., Wallace, D.M., Berger, S.L., Levinson, A.D., & Goeddel, D.V. (1982) Expression of human immune interferon cDNA in E. coli and monkey cells. *Nature* 295, 503 - 508
- Gray, P.W. & Goeddel, D.V. (1983) Cloning and expression of murine immune interferon cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5842 - 5846
- Gray, P.W., Glaister, D., Chen, E., Goeddel, D.V., & Pennica, D. (1986) Two interleukin 1 genes in the mouse: Cloning and expression of the cDNA for murine interleukin 1 β . *J. Immunol.* 137, 3644 - 3648
- Green, H. & Kehinde (1974) Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* 1, 113 - 116
- Green, H. & Meuth, M. (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3, 127 - 133
- Greenberger, J.S., Eckner, R.J., Sakakeeny, M., Marks, P., Reid, D., Nabel, G., Hapel, A.J., Ihle, J.N., & Humphries K.C. (1983) Interleukin 3-dependent hematopoietic progenitor cell lines. *Fed. Proc.* 42, 2762 - 2771
- Hamaguchi, Y., Kanakura, Y., Fujita, J., Takeda, S.-I., Nakano, T., Tarui, S., Honjo, T., & Kitamura Y. (1987) Interleukin 4 as an essential factor for in vitro clonal growth of murine connective tissue-type mast cells. *J. Exp. Med.* 165, 268 - 273

- Hapel, A.J., Warren, H.S., & Hume D.A. (1984)** Different colony-stimulating factors are detected by the "interleukin-3"-dependent cell lines FDC-P1 and 32Dcl-23.
Blood 64, 786 - 790
- Hapel, A.J., Fung, M.C., Johnson, R.M., Young, I.G., Johnson, G., & Metcalf, D. (1985)** Biologic properties of molecularly cloned and expressed murine interleukin 3.
Blood 65, 1453 - 1459
- Harrison, D.E. (1973)** Normal production of erythrocytes by mouse bone marrow continues for 73 months.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3184 - 3188
- Hayashi, C., Sonoda, T., Nakano, T., Nakayama, H., & Kitamura, Y. (1985)** Mast cell precursors in the skin of mouse embryos and their deficiency in embryos of *Sl/Sl^d* genotype.
Dev. Biol. 109, 234 - 241
- Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S.-I., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Matsui, H., Takahara, Y., Taniguchi, T., & Kishimoto, T. (1986)** Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin.
Nature 324, 73 - 76
- Huebner, K., Isobe, M., Croce, C.M., Golde, D.W., Kaufman, S.E., & Gasson, J.C. (1985)** The human gene encoding GM-CSF is at 5q21 - q32, the chromosome region deleted in the 5q⁻ anomaly.
Science 230, 1282 - 1285

Hültner, L., Moeller, J., Ring, J., Schmoeckel, C., Lau, B., Jäger, G., & Dörmer, P. (1985) Long-term culture of regulator-dependent murine bone marrow-derived mast cells.

GSF-Bericht 36/85

Hume, D.A., Robinson, A.P., MacPherson, G.G., & Gordon, S. (1983) The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localisation of antigen F4/80. The relationship between macrophages, Langerhans cells, reticular cells and dendritic cells in lymphoid and hematopoietic organs.

J. Exp. Med. 158, 1522 - 1536

Humphries, R.K., Eaves, A.C., & Eaves, C.J. (1979) Characterization of a primitive erythropoietic progenitor found in mouse marrow before and after several weeks in culture.

Blood 53, 746 - 763

Ichikawa, Y., Pluznik, D.H., & Sachs, L. (1966) In vitro control of the development of macrophage and granulocyte colonies.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 488 - 495

Ihle, J.N., Keller, J., Henderson, L., Klein, F., & Palaszynski, E. (1982) Procedures for the purification of interleukin 3 to homogeneity.

J. Immunol. 129, 2431 - 2436

Ihle, J.N., Keller, J., Oroszlan, S., Henderson, L.E., Copeland, T.D., Fitch, F., Prystowsky, M.B., Goldwasser, E., Schrader, J.W., Palaszynski, E., Dy, M., & Lebel, B. (1983) Biologic properties of homogeneous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, P cell-stimulating activity, and histamine-producing cell-stimulating activity.

J. Immunol. 131, 282 - 287

- Ikebuchi, K., Wong, G.G., Clark, S.C., Ihle, J.N., Hirai, Y., & Ogawa, M. (1987) Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 9035 - 9039
- Irani, A.A., Schechter, N.M., Craig, S.S., De Blois, G., & Schwartz, L.B. (1986) Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4464 - 4468
- Iscove, N.N. & Sieber, F. (1975) Erythroid progenitors in mouse bone marrow detected by macroscopic colony formation in culture.
Exp. Hematol. 3, 32 - 43
- Iscove, N.N., Guilbert, L.J., & Weyman, C. (1980) Complete replacement of serum in primary cultures of erythropoietin-dependent red cell precursors (CFU-E) by albumin, transferrin, iron, unsaturated fatty acids, lecithin and cholesterol.
Exp. Cell Res. 126, 121 - 126
- Ishizaka, T. (1981) Analysis of triggering events in mast cells for immunoglobulin E-mediated histamine release.
J. Allergy clin. Immunol. 67, 90 - 96
- Ishizaka, T., Ishizaka, K., Johansson, G.O., & Bennich, H. (1969) Histamine release from human leukocytes by anti- γ E antibodies.
J. Immunol. 102, 884 - 892
- Ishizaka, T., White, J.R., & Saito, H. (1987) Activation of basophils and mast cells for mediator release.
Int. Archs Allergy appl. Immun. 82, 327 - 332

- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S.D., Kaufman, R.J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S.J., Hewick, R., Fritsch, E.F., Kawakita, M., Shimizu, T., & Miyake, T. (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313, 806 - 810
- Jarrett, E.E.E. & Haig, D.M. (1984) Mucosal mast cells in vivo and in vitro. *Immunol Today* 5, 115 - 119
- Johnson, G.R. & Nicola, N.A. (1984) Characterization of two populations of CFU-S fractionated from mouse fetal liver by fluorescence-activated cell sorting. *J. Cell. Physiol.* 118, 45 - 52
- Kinzkofer, A., Meier, M., & Radola, B.J. (1983) Schnelle und vereinfachte Silberanfärbung von Proteinen bei der ultradünnschicht isoelektrischen Fokussierung. *In: Radola, B. J. (Ed.), Elektrophorese Forum '83, TU München.* 282 - 286
- Kitamura, Y. & Sonoda, T. (1984) Differentiation of mast cells and basophils. *In: Golde, Takaku (Ed.), Hematopoietic Stem Cells*, S. 65 - 80; Marcel Dekker Inc., New York.
- Kitamura, Y., Shimada, M., Hatanaka, K., & Miyano, Y. (1977) Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. *Nature* 268, 442 - 443
- Kitamura, Y., Kanakura, Y., Sonoda, S., Asai, H., & Nakano, T. (1987) Mutual phenotypic changes between connective tissue type and mucosal mast cells. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 82, 244 - 248

- Kobayashi, T., Nakano, T., Nakahata, T., Asai, H., Yagi, Y., Tsuji, K., Komiyama, A., Akabane, T., Kojima, S., & Kitamura, Y. (1986) Formation of mast cell colonies in methylcellulose by mouse peritoneal cells and differentiation of these cloned cells in both the skin and the gastric mucosa of W/W^v mice: Evidence that a common precursor can give rise to both "connective tissue-type" and "mucosal" mast cells.
J. Immunol. 136, 1378 - 1384
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4.
Nature 227, 680 - 685
- Lee, F., Yokota, T., Otsuka, T., Meyerson, P., Villaret, D., Coffman, R., Mosmann, T., Rennick, D., Reohm, N., Smith, C., Zlotnik, A., & Arai, K.-I. (1986) Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that expresses B-cell stimulatory factor 1 activities and T-cell- and mast-cell-stimulating activities.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2061 - 2065
- Lee, M., Segal, G.M., & Bagby, G.C. (1987) Interleukin-1 induces human bone marrow-derived fibroblasts to produce multilineage hematopoietic growth factors.
Exp. Hematol. 15, 983 - 988
- Levi-Schaffer, F., Austen, K.F., Gravalles, P.M., & Stevens, R.L. (1986) Coculture of interleukin 3-dependent mouse mast cells with fibroblasts results in a phenotypic change of the mast cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 6485 - 6488
- Lewis, R.A. & Austen, K.F. (1981) Mediation of local homeostasis and inflammation by leukotrienes and other mast cell-dependent components.
Nature 293, 103 - 108

- Lomedico, P.T., Gubler, U., Hellmann, C.P., Dukovich, M., Giri, J.G., Pan, Y.-C.E., Collier, K., Semionow, R., Chua, A.O., & Mizel, S.B. (1984)** Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in *Escherichia coli*.
Nature 312, 458 - 462
- Lopez, A.F., Begley, C.G., Williamson, D.J., Warren, D.J., Vadas, M.A., & Sanderson, C.J. (1986)** Murine eosinophil differentiation factor.
J. Exp. Med. 163, 1085 - 1099
- Lowenthal, J.W., Castle, B.E., Christiansen, J., Schreurs, J., Rennick, D., Arai, N., Hoy, P., Takebe, Y., & Howard, M. (1988)** Expression of high affinity receptors for murine interleukin 4 (BSF-1) on hemopoietic and nonhemopoietic cells.
J. Immunol. 140, 456 - 464
- Magli, M.C., Iscove, N.N., & Odartchenko, N. (1982)** Transient nature of early haematopoietic spleen colonies.
Nature 295, 527 - 529
- March, C.J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D.P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C.S., Kronheim, S.R., Grabstein, K., Conlon, P.J., Hopp, T.P., & Cosman, D. (1985)** Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs.
Nature 315, 641 - 647
- Marom, Z. & Casale, T.B. (1983)** Mast cells and their mediators.
Ann. Allergy 50, 367 - 370
- Metcalf, D. (1984)** The hemopoietic colony stimulating factors.
Amsterdam, Elsevier

- Metcalf, D. (1985)** The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors.
Science 229, 16 - 22
- Metcalf, D. (1986)** The molecular biology and function of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors.
Blood 67, 257 - 267
- Metcalf, D. & Johnson, G.R. (1978)** Production by spleen and lymph node cells of conditioned medium with erythroid and other hemopoietic colony stimulating activity.
J. Cell. Physiol. 99, 159 - 174
- Metcalf, D. & Moore, M.A.S. (1971)** Embryonic aspects of hemopoiesis.
In: Frontiers on Biology. Neuberger, A. & Tatum, E.L. (eds) Vol. 24, Hemopoietic cells. North-Holland publishing company Amsterdam, London, 172 - 271
- Minkowski, M. & Dy, M. (1988)** Histamine-producing cell stimulating activity (HCSA) induced by interleukin 3 (IL-3) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in human hemopoietic system. Hospital Necker, Paris.
European stem cell club meeting, 21. - 23. April 1988, Budapest.
- Miyake, T., Kung, C.K.-H., & Goldwasser, E. (1977)** Purification of human erythropoietin.
J. Biol. Chem. 252, 5558 - 5564
- Mochizuki, D.Y., Eisenman, J.R., Conlon, P.J., Larsen, A.D., & Tushinski, R.J. (1987)** Interleukin 1 regulates hematopoietic activity, a role previously ascribed to hemopoietin 1.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5267 - 5271

Molnar-Kimber, K.L., Webb, S.R., Sprent, J., & Wilson, D.B. (1980)
T cell lines with dual specificity for strong Mls and H-2 determinants.

J. Immunol. 125, 2643 - 2645

Moore, M.A.S., & Metcalf, D. (1970) Ontogeny of the hemopoietic system: Yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo.

Brit. J. Haematol. 18, 279 - 296

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays.

J. Immunol. Methods 65, 55 - 63

Mosmann, T.R., Bond, M.W., Coffman, R.L., Ohara, J., & Paul, W.E. (1986) T-cell and mast cell lines respond to B-cell stimulatory factor 1.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5654 - 5658

Mosmann, T.R., Yokota, T., Kastelein, R., Zurawski, S.M., Arai, N., & Takebe, Y. (1987) Species-specificity of T cell stimulating activities of IL-2 and BSF-1 (IL-4): Comparison of normal and recombinant, mouse and human IL-2 and BSF-1 (IL-4).

J. Immunol. 138, 1813 - 1816

Nabel, G., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Dvorak, H.F., & Cantor, H. (1981)
Inducer T lymphocytes synthesize a factor that stimulates proliferation of cloned mast cells.

Nature 291, 332 - 334

Nagao, K., Yokoro, K., & Aaronson S.A. (1981) Continuous lines of basophil/mast cells derived from normal mouse bone marrow.

Science 212, 333 - 335

- Newlands, G.F.J., Huntley, J.F., & Miller H.R.P. (1984) Concomitant detection of mucosal mast cells and eosinophils in the intestines of normal and *Nippostrongylus*-immune rats.
Histochemistry 81, 585 - 589
- Nicola, N.A., Metcalf, D., von Melchner, H., & Burgess, A.W. (1981) Isolation of murine fetal hemopoietic progenitor cells and selective fractionation of various erythroid precursors.
Blood 58, 376 - 386
- Nicola, N.A., Metcalf, D., Matsumoto, M., & Johnson, G.R. (1983) Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells: Identification as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF).
J. Biol. Chem. 258, 9017 - 9023
- Noma, Y., Sideras, P., Naito, T., Bergstedt-Lindquist, S., Azuma, C., Severinson, E., Tanabe, T., Kinashi, T., Matsuda, F., Yaoita, Y., & Honjo, T. (1986) Cloning of cDNA encoding the murine IgG1 induction factor by a novel strategy using SP6 promoter.
Nature 319, 640 - 646
- O'Garra, A., Umland, S., De France, T., & Christiansen, J. (1988) 'B-cell factors' are pleiotropic.
Immunol. Today 9, 45 - 54
- Ohara, J. & Paul W.E. (1985) Production of a monoclonal antibody to and molecular characterization of B-cell stimulatory factor-1.
Nature 315, 333 - 336
- Oppenheim, J.J., Kovacs, E.J., Matsushima, K., & Durum, S.K. (1986) There is more than one interleukin 1.
Immunol. Today 7, 45 - 56

- Otsuka, T., Miyajima, A., Brown, N., Otsu, K., Abrams, J., Sealand, S., Caux, C., de Waal Malefijt, R., de Vries, J., Meyerson, P., Yokota, K., Gemmel, L., Rennick, D., Lee, F., Arai, N., Arai, K.-I., & Yokota, T. (1988) Isolation and characterization of an expressible cDNA encoding human IL-3.
J. Immunol. 140, 2288 - 2295
- Paul, W.E. (1987) Interleukin 4/B cell stimulatory factor 1: one lymphokine many functions.
FASEB J. 1, 456 - 461
- Peschel, C., Paul, W.E., Ohara, J., & Green, I. (1987) Effects of B cell stimulatory factor-1/interleukin 4 on hematopoietic progenitor cells.
Blood 70, 254 - 263
- Pluznik, D.H. & Sachs, L. (1965) The cloning of normal "mast" cells in tissue culture.
J. Cell. Physiol. 66, 319 - 324
- Quesenberry, P., Song, Z., McGrath, E., McNiece, I., Shadduck, R., Waheed, A., Baber, G., Kleeman, E., & Kaiser D. (1987) Multilineage synergistic activity produced by a murine adherent marrow cell line.
Blood 69, 827 - 835
- Radola, B.J. (1980) Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μ m polyacrylamide gels on silanized glass plates of polyester films.
Electrophoresis 1, 43 - 56

- Razin, E., Stevens, R.L., Akiyama, F., Schmid, K., & Austen, K.F. (1982) Culture from mouse bone marrow of a subclass of mast cells possessing a distinct chondroitin sulfate proteoglycan with glycosaminoglycans rich in N-acetylgalactosamino-4,6-disulfate. *J. Biol. Chem.* 257, 7229 - 7236
- Rennick, D., Yang, G., Gemmell, L., & Lee, F. (1987) Control of hemopoiesis by a bone marrow stromal cell clone: lipopolysaccharide- and interleukin-1 - inducible production of colony-stimulating factors. *Blood* 69, 682 - 691
- Roberts, R., Gallagher, J., Spooncer, E., Allen, T.D., Bloomfield, F., & Dexter, T.M. (1988) Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis. *Nature* 332, 376 - 378
- Ross, E.A.M., Anderson, N., & Micklem, H.S. (1982) Serial depletion and regeneration of the murine hematopoietic system: Implications for hematopoietic organization and the study of cellular ageing. *J. Exp. Med.* 155, 432 - 444
- Sachs, L. (1987) The molecular control of blood cell development. *Science* 238, 1374 - 1379
- Sanderson, C.J., O'Garra, A., Warren, D.J., & Klaus G.G.B. (1986) Eosinophil differentiation factor also has B-cell growth factor activity: Proposed name interleukin 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 437 - 440
- Schmitt, E., van Brandwijk, R., Peters, C., Schwarzkopf, R., Zimmermann, F., & Rude, E. (1987a) Long-term proliferation of a murine L3T4⁺ T cell line in the presence of interleukin 4. *Immunobiology* 175, 316

Schmitt, E., Fassbender, B., Beyreuther, K., Speath, E., Schwarzkopf, R., & Rüde, E. (1987b) Characterization of a T cell-derived lymphokine that acts synergistically with IL 3 on the growth of murine mast cells and is identical with IL 4.

Immunobiology 174, 406 - 419

Schrader, J.W. (1986) The panspecific hemopoietin of activated T lymphocytes (interleukin-3).

Ann. Rev. Immunol. 4, 205 - 210

Segal, G.M., McCall, E., Stueve, T., & Bagby, G.C. (1987) Interleukin 1 stimulates endothelial cells to release multilineage human colony-stimulating activity.

J. Immunol. 138, 1772 - 1778

Shore, V.G. & Shore B. (1973) Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components.

Biochemistry 12, 502 - 507

Sieff, C.A. (1987) Hematopoietic growth factors.

J. Clin. Invest. 79, 1549 - 1557

Siminovitch, L., McCulloch, E.A., & Till, J.E. (1963) The distribution of colony-forming cells among spleen colonies.

J. Cell. Comp. Physiol. 62, 327 - 336

Smith, C.A. & Rennick, D.M. (1986) Characterization of a murine lymphokine distinct from interleukin 2 and interleukin 3 (IL-3) possessing a T-cell growth factor activity and a mast-cell growth factor activity that synergizes with IL-3.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1857 - 1861

- Souza, L.M., Boone, T.C., Gabrilove, J., Lai, P.H., Zsebo, K.M., Murdock, D.C., Chazin, V.R., Bruszewski, J., Lu, H., Chen, K.K., Barendt, J., Platzer, E., Moore, M.A.S., Mertelsmann, R., & Welte, K. (1986) Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: Effects on normal and leukemic myeloid cells.
Science 232, 61 - 65
- Stanley, E.R. & Heard, P.M. (1977) Factors regulating macrophage production and growth: Purification and some properties of the colony stimulating from medium conditioned by mouse L cells.
J. Biol. Chem. 252, 4305 - 4312
- Stanley, E.R., Metcalf, D., Sobieszczuk, P., Gough, N.M., Dunn, A.R., (1985) The structure and expression of the murine gene encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Evidence for utilization of alternative promoters.
EMBO J. 4, 2569 - 2573
- Strife, A., Lambek, C., Wisniewski, D., Gulati, S., Gasson, J., Golde, D., Welte, K., Gabrilove, J., & Clarkson, B. (1987) Activities of four purified growth factors on highly enriched human hematopoietic progenitor cells.
Blood 69, 1508 - 1523
- Sullivan, T.J. & Parker, C.W. (1976) Pharmacologic modulation of inflammatory mediator release by rat mast cells.
Am. J. Path. 84, 437 - 462
- Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R., & Hamuro, J. (1983) Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2.
Nature 302, 305 - 310

- Tertian, G., Yung, Y.P., Guy-Grand, D., & Moore M.A.S. (1981) Long-term in vitro culture of murine mast cells. I. Description of a growth factor-dependent culture technique.
J. Immunol. 127, 788 - 794
- Till, J.E. & McCulloch, E.A. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells.
Radiat. Res. 19, 213 - 222
- Till, J.E., McCulloch, E.A., & Siminovitch, L. (1964) Stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen colony-forming cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51, 29 - 36
- Valeriote, F. & Tolen, S. (1983) Extensive proliferative capacity of haemopoietic stem cells.
Cell Tissue Kinet. 16, 1 - 5
- van Damme, J., Cayphus, S., Opdenakker, G., Billiau, A., & van Snick, J. (1987) Interleukin 1 and poly(rI)×poly(rC) induce production of a hybridoma growth factor by human fibroblasts.
Eur. J. Immunol. 17, 1 - 7
- van Snick, J., Cayphas, S., Vink, A., Uyttenhove, C., Coulie, P.G., Rubira, M.R., & R. J. Simpson, R.J. (1986) Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9679 - 9683
- Walker, F., Nicola, N.A., Metcalf, D., & Burgess, A.W. (1985) Hierarchical down-modulation of hemopoietic growth factor receptors.
Cell 43, 269 - 276

- Warren, D.J. & Sanderson, C.J. (1985) Production of a T-cell hybrid producing a lymphokine stimulating eosinophil differentiation. *Immunology* 54, 615 - 623
- Watson, D., Harvey, M., & Dean, P. (1978) The selective retardation of NADP - dependent dehydrogenases by immobilized Procion Red HE-3B. *Biochem. J.*, 173, 591 - 596
- Weber, K. & Kuter, D.J. (1971) Reversible denaturation of enzymes by sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.* 246, 4504 - 4059
- Welte, K., Platzer, E., Lu, L., Gabrilove, J.L., Levi, E., Mertelsmann, R., & Moore, M.A.S. (1985) Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1526 - 1530
- Wong, G.G., Witek, J., Temple, P.A., Wilkens, K.M., Leary, A.C., Luxenberg, D.P., Jones, S.S., Brown, E.C., Kay, R.M., Orr, E.C., Shoemaker, C., Golde, D.W., Kaufman, R.J., Hewick, R.M., Wang, E.A., & Clark, S.C. (1985) Human GM-CSF: Molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science* 228, 810 - 815
- Wong, G.G., Temple, P.A., Leary, A.C., Witek-Giannotti, S., Yang, Y.-C., Ciarletta, A.B., Chung, M., Murtha, P., Kriz, R., Kaufman, R.J., Ferenz, C.R., Sibley, B.S., Turner, K.J., Hewick, R.M., Clark, S.C., Yanai, N., Yokota, H., Yamada, M., Saito, M., Motoyoshi, K., & Takaku, S. (1987) Human CSF-1: Molecular cloning and expression of 4 kb cDNA encoding the human urinary protein. *Science* 235, 1504 - 1509

- Wu, A.M., Till, J.E., Siminovitch, L., & McCulloch, E.A. (1967)
A cytological study of the capacity for differentiation of normal
hemopoietic colony forming cells.
J. Cell. Physiol. 69, 177 - 184
- Yang, Y.-C., Ciarletta, A.B., Temple, P.A., Chung, M.P., Kovacic, S.,
Witek-Giannotti, J.S., Leary, A.C., Kriz, R., Donahue, R.E., Wong,
G.G., & Clark, S.C. (1986) Human IL-3 (Multi-CSF): Identification
by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor
related to murine IL-3.
Cell 47, 3 - 10
- Yang, Y.-C., Tsai, S., Wong, G.G., & Clark, S.C. (1988) Interleukin-1
regulation of hematopoietic growth factor production by human
stromal fibroblasts.
J. Cell. Physiol. 134, 292 - 296
- Yasukawa, K., Hirano, T., Watanabe, Y., Muratani, K., Matsuda, T.,
Nakai, S., & Kishimoto, T. (1987) Structure and expression of
human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene.
EMBO J. 6, 2939 - 2945
- Ymer, S., Tucker, W.Q.J., Sanderson, C.J., Hapel, A.J., Campbell, H.D.,
& Young, I.G. (1985) Constitutive synthesis of interleukin-3 by
leukaemia cell line WEHI-3B is due to retroviral insertion near
the gene.
Nature 317, 255 - 258
- Yokota, T., Lee, F., Rennick, D., Hall, C., Arai, N., Mosmann, T.,
Nabel, I.G., Cantor, H., & Arai, K. (1984) Isolation and charac-
terization of a full-length cDNA for mast cell growth factor
from a mouse T-cell clone: Expression in monkey cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1070 - 1074

- Yokota, T., Arai, N., Lee, F., Rennick, D., Mosmann, T., & Arai, K.-I. (1985) Use of a cDNA expression vector for isolation of mouse interleukin 2 cDNA clones: Expression of T-cell growth-factor activity after transfection of monkey cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 68 - 72
- Yokota, T., Otsuka, T., Mosmann, T., Banchereau, J., de France, T., Blanchard, D., de Vries, J.E., Lee, F., & Arai, K.-I. (1986) Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5894 - 5898
- Yokota, T., Coffman, R.L., Hagiwara, H., Rennick, D.M., Takebe, Y., Yokota, K., Gemmell, L., Shrader, B., Yang, G., Meyerson, P., Luh, J., Hoy, P., Pène, J., Brière, F., Spits, H., Banchereau, J., De Vries, J., Lee, F.D., Arai, N., & Arai, K.-I. (1987) Isolation and characterization of lymphokine cDNA clones encoding mouse and human IgA-enhancing factor and eosinophil colony-stimulating factor activities: Relationship to interleukin 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7388 - 7392
- Yung, Y.-P., Eger, R., Tertian, G., & Moore, M.A.S. (1981) Long-term in vitro culture of murine mast cells. II. Purification of a mast cell growth factor and its dissociation from TCGF. *J. Immunol.* 127, 794 - 799
- Ziegler, I., Hamm, U., & Berndt, J. (1983) Participation of pterins in the control of lymphocyte stimulation and lymphoblast proliferation. *Cancer Res.* 43, 5356 - 5359

LEBENS LAUF

Name:	Jochen Moeller
Geburtsdatum:	03.04.1955
Geburtsort:	Grafrath
Eltern:	Heinz Moeller Elfriede Moeller, geb. Sachs
1961 - 1966	Volksschule Grafrath
1966 - 1976	math. nat. Gymnasium der Gesamtschule Marktoberdorf
Juni 1976	Abitur
1976 - 1981	Chemiestudium an der Ludwig-Maximilians- Universität München
Mai 1979	Diplom - Vorprüfung
Nov. 1981	Diplom - Hauptprüfung
Jan. - Dez. 1982	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. K. Hannig am Max - Planck - Institut für Biochemie, Martinsried
1983 - 1984	Wehrpflicht
Nov. 1984 - Juni 1988	Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. P. Dörmer am Institut für Experimentelle Hämatologie der GSF, München

